

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 8 月 11 日 (11.08.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/073379 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/12, C07K 14/47
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/001870
- (22) 国際出願日: 2005 年 2 月 2 日 (02.02.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 60/541,287 2004 年 2 月 2 日 (02.02.2004) US
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ロコモジェン (LOCOMOGENE, INC.) [JP/JP]; 〒1050001 東京都港区虎ノ門 4-1-1 虎ノ門パストラル本館 7 階 Tokyo (JP). 学校法人聖マリアンナ医科大学 (ST. MARIANNA UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE) [JP/JP]; 〒2168511 神奈川県川崎市宮前区菅生 2-16-1 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 太田 智彦 (OHTA, Tomohiko) [JP/JP]; 〒1550032 東京都世田谷区代沢 5-13-2 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CARCINOSTATIC METHOD USING BRCA1-BARD1 PATHWAY

(54) 発明の名称: BRCA1-BARD1 経路を用いた癌抑制方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of the polyubiquitination of nucleophosmin which comprises reacting nucleophosmin with BRCA1-BARD1 *in vitro* or *in vivo*. It is also intended to provide a method of inhibiting the polyubiquitination of nucleophosmin which comprises phosphorylating BARD1 by using CDK2-cyclin E and/or CDK2-cyclin A.

(57) 要約: 本発明は、*in vitro* 又は *in vivo* において、ヌクレオフォスミンを BRCA1-BARD1 と反応させることを含む、ヌクレオフォスミンをポリユビキチン化する方法を提供する。本発明はまた、CDK2-サイクリン E 及び／又は CDK2-サイクリン A を用いて BARD1 をリン酸化することを含むヌクレオフォスミンのポリユビキチン化を抑制する方法を提供する。



WO 2005/073379 A1

明 細 書

BRCA1-BARD1経路を用いた癌抑制方法

技術分野

- 5 本発明は、ヌクレオフォスミンをBRCA1-BARD1と反応させることを含む、ヌクレオフォスミンをポリユビキチン化する方法に関する。

背景技術

- BRCA1は、乳癌及び卵巣癌の癌抑制遺伝子であり、乳癌研究の分野で最も重要な遺伝子の一つである¹⁻⁴。最近、本発明者らは、BRCA1及びBARD1がRINGヘテロダイマー型ユビキチンリガーゼを形成すること、家族性乳癌の原因となるBRCA1におけるミスセンス変異により、このリガーゼ活性が完全に失活することを発見した^{1,9}。さらに、本発明者らは、BRCA1-BARD1によって触媒されるポリユビキチン鎖が、26Sプロテアソームによるタンパク質分解のシグナルとして機能する従来のLys-48結合型ではなく、今までにないLys-6結合型のユビキチン鎖であること、および、*in vitro*ではこれらのポリユビキチン鎖が26Sプロテアソームによって脱ユビキチン化されることを報告した^{2,3}。しかし、このユビキチンリガーゼの活性が、BRCA1の癌抑制機能にどのように関わっているのかについては、明らかにされていない。この主な理由は、リガーゼ活性の基質が同定されていなかったことと、活性を制御する上流のシグナルが明らかになかったことによるものである。

- NPMは、G1期の間は中心体に存在し、NPMがG1/S移行期の間にCDK2-サイクリンEによってリン酸化され、中心体より離れることにより、中心体複製が開始することが報告されている^{7,8}。NPMは分裂期には再び中心体に戻り、分裂後の娘細胞の中心体がNPMを有するようになることから、NPMが中心体複製のライセンス因子である可能性が指摘されている。しかし、どのようにしてNPMが分裂期に中心体に戻ってくるのかは明らかにされていない。一方、BRCA1の欠失によって中心体の過剰複製が引き起こされ、ゲノムを不安定化させることが分かっているが、そのメカニズムも明らかとなっていない。

発明の開示

上記のように、BRCA1-BARD1 リガーゼがどのようにしてDNA修復、細胞周期の進行及び中心体の複製等の、様々な細胞の過程を調節するのかについては明らかではない⁴⁻⁶。そこで、本発明は、ヌクレオフォスミンをBRCA1-BARD1と反応させることを含む、ヌクレオフォスミンをポリユビキチン化することを目的とする。本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、BRCA1-BARD1 が、核内リン酸化タンパク質であるヌクレオフォスミン/B23(NPM)と結合し、NPMのポリユビキチン化を触媒することでNPMが安定化されることを見出した。

本発明の一つの態様において、ヌクレオフォスミンをBRCA1-BARD1と反応させることを含む、ヌクレオフォスミンをポリユビキチン化する方法が提供される。本方法において、ポリユビキチン化は*in vitro*、又は、*in vivo*において実施することができる。

本発明の一つの態様として、ヌクレオフォスミンをポリユビキチン化することを含む、ヌクレオフォスミンを安定化させる方法が提供される。

本発明の他の一つの態様として、CDK2-サイクリンE及び／又はCDK2-サイクリンAを用いてBARD1をリン酸化することを含む、ヌクレオフォスミンのポリユビキチン化を抑制する方法、BRCA1-BARD1を解離させる方法、BRCA1-BARD1のユビキチンリガーゼ活性を不活化する方法が提供される。本方法においては、BARD1のリン酸化部位は、S148、S251、S288及びT299からなる群から選ばれる少なくとも3つの部位でありうる。また、前記部位は、S148、S288及びT299でもよく、S148、S251、S288及びT299でもよい。

本発明の一つの態様として、BRCA1並びにCDK2-サイクリンE及び／又はCDK2-サイクリンAを共発現させることを含む、BRCA1を核から細胞質へ輸送させる方法が提供される。

図面の簡単な説明

図1は、2つの異なるスクリーニングによりBRCA1-BARD1リガーゼの基質と

してNPMが同定されたことを示す図である。[*]及び[* *]は、それぞれ Myc-BRCA1 (1-772)及びHA-BARD1を示す。

図2は、BRCA1-BARD1によるNPMのユビキチン化を示す図である。Aにおける矢印頭は、非-ユビキチン化Flag-NPMの位置を示す。Dにおける矢印頭は、ユビキチン化Flag-NPMの位置を示す。[*]は、IgGを示す。

図3は、BRCA1-BARD1によるNPMのユビキチン化はプロテアソーム分解のシグナルではないことを示す図である。Aのレーン1-4は、Flag-NPMを0.5 μ g、レーン2ではMyc-BRCA1¹⁻⁷⁷²及びHA-BARD1を0.05 μ g、レーン3では、Myc-BRCA1¹⁻⁷⁷²及びHA-BARD1を0.25 μ g、レーン4では、Myc-BRCA1¹⁻⁷⁷²及びHA-BARD1を1 μ g、プラスミドを293T細胞にトランスフェクトしたものである。

図4は、分裂期における、NPMとBRCA1-BARD1との共在及びNPMのユビキチン化を示す図である。AのMergeは、2つのタンパク質(NPMとBARD1)の画像を重ね合わせたものを示す。BおよびCのMergeは2つのタンパク質(B: BRCA1と α/β -tubulin C: NPMとBRCA1)及び核の画像を重ね合わせたものを示す。Dでは、フローサイトメトリーでモニターしたDNA含量を上部に示す。

図5は、BARD1の細胞周期に依存した発現を示す図である。Aはダブルチミジンブロックによる細胞周期の同調、Bはチミジンノコダゾールブロックによる同調を示す。各図の上部は、ブロックを解除した後の各タンパク質の発現を免疫ブロットで経時的に示した結果を、下のグラフは阻害を解除した後の細胞周期の経過をFACS分析でモニターした結果を示す。Asynは非同調細胞を示す。

図6は、CDK2サイクリンA1/E1及びCDK1サイクリンB1が、BARD1のNH₂末端側をリン酸化することを示す図である。*はIgGを、WTは野生型を、K2/E1はCDK2-cyclin E1を、K2/A1はCDK2-cyclin A1を、K1/B1はCDK1-cyclin B1、HA-BARD1^Pはリン酸化HA-BARD1をそれぞれ示す。

図7 A-Cは、CDK-サイクリンE及びCDK-サイクリンAが、NPMのユビキチン化を抑制することを示す図である。K2/EはCDK2-サイクリンEを、K2/AはCDK2-サイクリンAを、K1/BはCDK1-サイクリンBをそれぞれ示す。Dは、CDK2-サイクリンE1及びCDK2-サイクリンA1が濃度依存的にBRCA1-BARD1のユビキチンリガーゼ活性を抑制することを示す図である。レーン2及び6ではCDK2-サイクリン

ンE1量0.2 μ gを、レーン3及び7ではCDK2-サイクリンE1量0.6 μ gを、レーン4及び8ではCDK2-サイクリンE1量2 μ g加えたものである。WTは野生型を、MTはBARD1^{S148A/S251A/S288A/T299A}を示す。

図8は、BRCA1及びBARD1は、細胞質に輸送され、CDK2-cyclin E1との共発
5 現により不安定化することを示す図である。A. 上段は抗-HA抗体を、下段は抗-HA
抗体反応後抗-Myc抗体を再プローブした免疫ブロットで解析していることを示
す。B. レーン2はCDK2-サイクリンE1を0.1 μ g、レーン3は0.5 μ g、レーン4は
1.5 μ g加えたものである。Myc-BRCA1¹⁻⁷⁷²、HA-BARD1はどのレーンにも各々1
10 μ g加えている。各々のタンパク質の定常状態は、上段では、抗-HA抗体を、2段
目では、抗-HA抗体反応後に抗-Myc 再プローブを用いて免疫ブロットで解析し
ていることを示す。C. 上段ではMyc-BRCA1¹⁻⁷⁷²、HA-BARD1及びpcDNA3ベク
ターを用いて、下段では、Myc-BRCA1¹⁻⁷⁷²、HA-BARD1及びCDK2-サイクリン
E1を293T細胞に強制発現させたものである。D. レーン1及び2では、FLAG-
BRCA1、HA-BARD1及びpcDNA3ベクターを用いて、レーン3及び4では、FLAG-
15 BRCA1、HA-BARD1及びCDK2-サイクリンE1を用いたことを示す。また、Nは
核を、Cは細胞質を示す。2段目は、上段を更に長時間露光した場合を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、ヌクレオフォスミンをBRCA1-BARD1と反応させることを含む、ヌ
20 クレオフォスミンをポリユビキチン化する方法に関する。NPMは、M期において
紡錘体極でBRCA1と共在し、ユビキチン化される。G1/S移行期及びS期の間は
CDK2-サイクリンE及びCDK2-サイクリンAが、NPMをリン酸化し、NPMを中心
体から解離することが知られている^{7,8}が、興味深いことに、この時期にCDK2は
BARD1をもリン酸化する。この結果、BRCA1-BARD1解離が起こり、従って、
25 BRCA1-BARD1によるNPMのユビキチン化が抑制される。BRCA1の欠失により
中心体過剰複製、染色体分配異常が起こるが、この新規なCDK2-BRCA1-NPM経
路が、中心体複製におけるBRCA1の役割を担うメカニズムであることが示される。

以下、本発明について詳細に説明する。

1. ヌクレオフォスミン、BRCA1、BARD1

本発明のヌクレオフォスミン(以下、「NPM」という場合がある)とは、BRCA1-BARD1ユビキチンリガーゼの基質である。全ての細胞において、リボゾーム生合成、アポトーシス抑制、ヒストンシャペロン機能など、多様な生物学的活性を有する。ヌクレオフォスミンには、例えば、ヌクレオフォスミン/B23/NO38 (NPM)が含まれる。ヌクレオフォスミンは、本発明者らによって、質量分析器(LC/MS/MS)を用いた2つのスクリーニングによりBRCA1-BARD1の基質として同定された。NPMは、M期において紡錘体極でBRCA1と共在し、ユビキチン化される。G1/S移行期及びS期の間はCDK2-サイクリンE及びCDK2-サイクリンAが、NPMをリン酸化し、NPMを中心体から解離し、中心体を娘中心小体に分割させることが知られている^{7,8}。S期の間、NPMは中心体と結合できないが、その間、娘中心小体が中心体、それに続いて2つの紡錘体極に成熟する。従って、中心体複製の制御機構としてCDK2-BRCA1-NPM経路が存在し、BRCA1-BARD1によるNPMのユビキチン化が、分裂期の間にNPMが紡錘体極に再局在するのに重要な役割を果たしている。

BRCA1は、乳癌及び卵巣癌の癌抑制遺伝子であり、乳癌研究の分野で最も重要な遺伝子の一つである。また、BRCA1は、BARD1と共にRINGヘテロダイマーを形成すると、高いユビキチンリガーゼ活性を獲得する¹⁻⁴。マウスの*Brca1*遺伝子の標的破壊により中心体の過剰増幅とゲノム不安定性がおこる^{13,14}。分裂期の間にBRCA1は中心体に局在する。また、BRCA1は γ -チューブリンと結合することが報告されている^{15,16}。

BARD1は、BRCA1と結合するRingフィンガー蛋白質 (BRCA1 associated Ring Domain1) として同定された。

BRCA1及びBARD1は、RINGヘテロダイマー型ユビキチンリガーゼを形成するが、家族性乳癌の原因となるBRCA1におけるミスセンス変異により、このリガーゼ活性は完全に失活する^{1,9}。

BRCA1-BARD1リガーゼは、DNA修復、細胞周期の進行及び中心体の複製等の様々な細胞の過程を調節する。免疫細胞染色実験によれば、細胞周期の各期のNPM、BRCA1及びBARD1の挙動は以下の通りである。すなわち、間期において

NPMは核小体に存在するが、BRCA1とBARD1は核小体以外の核内に存在する。しかし、分裂期には、それらは、紡垂体付近の核周辺及び中心体（紡錘体極）に共在する。さらに、チミジン-ノコダゾールブロックによって細胞周期を分裂期に同調させたHeLa細胞を用いた試験により、NPMは、分裂期からG1期に移行する
5 短期間にポリユビキチン化されることが判明した。細胞周期の間の細胞内局在及びNPMとの共在を観察するために、BARD1のC末端に対するウサギポリクローナル抗体を調製して用いることができる。細胞周期の同調はフローサイトメトリーでモニターし、*in vivo*でのNPMユビキチン化をIP-ウェスタン解析により評価することができる。

- 10 さらに、BRCA1-BARD1によって触媒されるポリユビキチン鎖は、26Sプロテアソームによるタンパク質分解のシグナルとして機能する従来のLys-48結合型ではなくLys-6結合型のユビキチン鎖であり、*in vitro*ではこれらの鎖が26Sプロテアソームによって脱ユビキチン化される^{2,3}。NPMも、*in vivo*でBRCA1-BARD1によりユビキチン化され、安定化するが、このユビキチン化は、26Sプロテアソーム依存性タンパク質分解のシグナルとしては機能しない。

- 15 NPMはまた、分裂期の間に紡垂体極に再分布することは注目に値する¹⁷。BRCA1-BARD1によるNPMのユビキチン化は、この再分布にとって重要であり得、その欠如により中心体の過剰複製が起こりうる。さらに、NPMの多くの機能、すなわちDNA損傷後のアップレギュレーション¹⁸、細胞周期とアポトーシス^{19,20}及び
20 クロマチンリモデリングにおける役割^{21,22}がBRCA1の機能と重複している。従って、BRCA1-BARD1によるNPMのユビキチン化は、BRCA1の公知の機能を担う一つのメカニズムでありうる。

2. ユビキチン化/ポリユビキチン化

- 25 ユビキチン化とは、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)およびユビキチンリガーゼ(E3)などの酵素が協同して、基質となるタンパク質にユビキチンを次々と結合させていく過程である。このユビキチン化の生理的意義は、基質を26Sプロテアソーム-依存性分解へと導くことであり、これはユビキチン上のLys-48を介したユビキチン-ユビキチン連結による^{11, 12}。しかし、本発明者や

他の研究者らは、最近、BRCA1-BARD1が従来とは異なるLys-6結合型ポリユビキチン鎖の形成を触媒することを発見したが、それは、分解の標的とされる代わりに、*in vitro*において、精製26Sプロテアソームにより脱ユビキチン化されるというものである^{2, 3}。

- 5 本明細書において「自己ユビキチン化」とは、BRCA1-BARD1がユビキチンリガーゼ活性を有することにより、BRCA1自体がユビキチン化の基質タンパク質となり、他のユビキチンリガーゼによることなく自らユビキチンを結合させるものである。

- 10 NPMのユビキチン化は、26Sプロテアソーム依存性タンパク質分解のシグナルとしては機能しない。BRCA1-BARD1-介在NPMユビキチン化がNPMを分解するための標的とするのか否かは*in vivo*での安定性を測定することにより判断できる。この場合、NPM単独で発現させた場合と、BRCA1-BARD1存在下で共発現させた場合に、共発現の場合の方がNPMの安定性が高い場合は、BRCA1-BARD1によるNPMユビキチン化はプロテアソーム分解のシグナルではないとい
- 15 える。また、BRCA1-BARD1-介在NPMユビキチン化がNPMを分解するための標的とするのか否かはパルスチーチェイス分析によっても測定できるし、プロテアソーム阻害剤であるMG132又はLLnLによる処理をすることもできる。この場合、ユビキチン化Flag-NPM量が増加しない場合に、BRCA1-BARD1によるNPMユビキチン化はプロテアソーム分解のシグナルではないといえる。これらの知見は、
- 20 BRCA1-BARD1によるNPMユビキチン化が、タンパク質分解以外のメカニズムを介してNPMの機能に影響を与えることを示す。

- 25 NPMは、また、*in vitro*でもBRCA1-BARD1によりユビキチン化されることが明らかである。BRCA1-BARD1が*in vitro*でNPMをユビキチン化するか否かは、リコンビナントタンパク質のみを用いた*in vitro*のシステムで試験することができる。例えば、タグ標識したNPM、BRCA1及びBARD1とE1、E2、ユビキチンとをインキュベートし、タグ標識したNPMを、適当な抗体を用いて免疫ブロットを行うことができる。このような系を用いると、精製システムにおけるBRCA1-BARD1-依存性NPMユビキチン化が示される。

3. CDK2-サイクリンによるBARD 1 のリン酸化

CDKとは、サイクリン依存性キナーゼをいい、CDK2-サイクリンEは、CDK2とサイクリンEとの複合体を、CDK2-サイクリンAは、CDK2とサイクリンAとの複合体をそれぞれ意味する。両者は共に細胞周期調節系で協働しており、CDK2-サイクリンEの複合体は、細胞のG₁/Sコミットメントポイント（開始点）通過を誘導し、さらにCDK2-サイクリンAの複合体が続くDNA複製装置の活性化に必要と考えられている。なお、本明細書の以下に記載がある、サイクリンBは、CDK1 (cdc2) 複合体を形成し、分裂期の開始を誘導するものである。

このCDK2-サイクリンE及びCDK2-サイクリンAは、*in vivo*において、完全にBRCA1-BARD1によるNPMのポリユビキチン化を抑制する。CDK2がBRCA1-BARD1によるNPMのユビキチン化を抑制するメカニズムとして2つのことが考えられる。

1) CDK2によるNPMのリン酸化によってBRCA1-BARD1がNPMを認識できなくなる。

2) CDK2はBRCA1-BARD1リガーゼを直接リン酸化し、その活性を抑制する。

2つのモデルを区別するために、まず、BRCA1-BARD1リガーゼが、CDK2リン酸化部位を有しない変異体をユビキチン化しうるか否かを試験することができる。これにより、上記変異体は、BRCA1-BARD1リガーゼによってユビキチン化され、このユビキチン化はCDK2によって抑制されることが分かる。BARD1はCDK2-サイクリンE1の基質なので、BRCA1-BARD1ユビキチンリガーゼ活性の抑制は、BARD1のリン酸化に直接影響を受けている可能性がある。しかし、BARD1の非リン酸化変異体を介したBRCA1の自己ユビキチン化も、CDK2-サイクリンE1によって抑制されるため、CDK2によるNPMユビキチン化の抑制が全てBARD1のリン酸化に起因するものではないことがわかる。

CDKによるBARD1のリン酸化は、BARD1とCDK-サイクリンを共発現させた場合に、BARD1の分子量が変動するかを測定することにより解析することができる。この泳動位置の変化は、BARD1の免疫沈降物をアルカリフォスファターゼ処理することにより消失する。この現象も、BARD1がCDK2キナーゼの基質であることを裏づけている。この場合に、BARD1のNH₂末端断片やBARD1のCOOH末

端断片などを用いることにより、BARD1のリン酸化がどの領域で起こっているかを決定することができる。また、CDKが、BARD1を直接リン酸化するか否かを検討するには、BARD1が*in vitro*でCDKの基質となりうるか検討すればよい。これにより、BARD1は、NH₂末端側で、BRCA1-BARD1のヘテロダイマー形成とは独立した態様でCDK1及びCDK2によりリン酸化されることが示される。

5 BARD1のNH₂末端側にリン酸化部位がS¹⁴⁸/S²⁵¹/S²⁸⁸/T²⁹⁹の4箇所あることがわかる。これらの4つの部位を変異させた変異体は、CDK2-サイクリンE1によってもCDK1-サイクリンB1によってもほとんど分子量の変動を示さないため、この4ヶ所がリン酸化部位であることが示された。BARD1の上記変異体はCDK2によるユビキチンリガーゼ活性の抑制に感受性を有したままであるし、CDK1がCDK2と同じ部位でBARD1をリン酸化しても、BRCA1-BARD1のリガーゼ活性は抑制されないため、リン酸化自体は、BRCA1-BARD1ユビキチンリガーゼのダウンレギュレーションにそれほど重要ではないと考えられる。BARD1とCDK1-サイクリンBとの共発現が*in vivo*でBARD1のリン酸化を引き起こすが、BARD1とBRCA1との結合には影響しないことは、BRCA1-BARD1の機能は、細胞周期中の各時期における細胞周期キナーゼによりそれぞれ異なった制御を受けていることを示す。

上記のCDK2-サイクリンE及びCDK2-サイクリンAによるBARD1のリン酸化によりBRCA1及びBARD1は解離し、その結果、ユビキチンリガーゼ活性が不活化される。BRCA1自己ユビキチン化を測定することにより、BRCA1-BARD1ヘテロダイマー固有のリガーゼ活性に対する、CDK2-サイクリンE及びCDK2-サイクリンAの効果を試験することができる。それによれば、CDK1-サイクリンBがBRCA1の自己ユビキチン化を抑制しないのに対し、CDK2-サイクリンE及びCDK2-サイクリンAはともにBRCA1の自己ユビキチン化を完全に抑制する。注目すべきことに、CDK2-サイクリンE及びCDK2-サイクリンAはともに、BRCA1-BARD1を分解する。

サイクリンEのタンパク質レベルでの発現は、散発性乳癌において顕著に変動しており、その高度な発現レベルは、悪性予後と有意に相関する²³。

本発明に関して、CDK2-サイクリンE1及びA1がBRCA1及びBARD1のタンパ

ク質発現にどのような影響を与えるかについては、ユビキチンリガーゼ活性に対応するBRCA1及びBARD1の定常状態レベルが、用量依存的にCDK1・サイクリンB1ではなく、CDK2・サイクリンE1/A1により劇的に減少する。また、細胞を[³⁵S]-メチオニンでラベルしパルス・チェイス試験する場合、BRCA1-BARD1複合

5 体をCDK2・サイクリンE1で共発現させると、細胞中での半減期は、顕著に減少することから、タンパク質発現の減少はタンパク質の分解によるものであることが示される。本発明により、高レベルのサイクリンEの存在は、BRCA1のユビキチンリガーゼ活性を低下させることが示される。したがって、BRCA1のユビキチンリガーゼ活性は、家族性乳癌に加え、散発性乳癌にも関与していることが示され

10 る。

4. BRCA1の核から細胞質への輸送

以前、BRCA1及びBARD1は、核から細胞質への輸送により分解されるという報告があった。CDK2・サイクリンE1をBRCA1と共発現させた場合の、核および

15 細胞質中のBRCA1タンパク質レベルを定量すると、CDK2・サイクリンE1が存在しない場合、細胞質のBRCA1のタンパク質レベルは、核で観察されるタンパク質レベルよりも低く、CDK2・サイクリンE1と共発現させた場合は、細胞質BRCA1タンパク質のレベルは、核で見られるタンパク質レベルよりも高いことが判明した。従って、CDK2・サイクリンE1の存在下で、BRCA1は核から細胞質へ輸送さ

20 れると考えられる。

以下、実施例により、本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は、これら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

本実施例全体を通し、所定の方法は、以下の通りに行った。

25 方法

抗体、発現構築体及び精製タンパク質

HA (12CA5, Boehringer, Mannheim)、Myc (9E10, BabCo)、Flag (M2, Sigma)、ポリユビキチン(Affiniti)、 α -及び β -チューブリン(DMIA+BMIB, Neomarkers)及びNPM (Sigma-Aldrich又はZymed)に対するマウスモノクローナル抗体並び

にBRCA1に対するウサギポリクローナル抗体である(Santa Cruz c-20)は市販のものを購入した。BARD1のC末端に対して作製されたウサギポリクローナル抗体を合成ペプチドCVMSFELLPLDS (配列番号 3) を用いて生成し、使用前にアフィニティー精製した。細胞の蛍光免疫染色における特異性を競合ペプチドを用いて

5 確認した。

全長ヒトNPM (B23.1)のcDNA (配列番号 1) を、HeLa細胞のcDNAライブラリーからPfxポリメラーゼ(Stratagene)を用いてPCRで増幅した。増幅した全長ヒトNPM (B23.1)のcDNAを、N-末端Flag tagを有する哺乳動物発現pcDNA3ベクター、又は、N-末端 6x His-Flag tagを有する大腸菌発現ベクターであるpETに

10 サブクローニングした。BRCA1、BARD1及びHA-ユビキチン用の哺乳動物発現プラスミドはHashizume, R. et al. The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. J. Biol. Chem. 276, 14537-14540 (2001)、Nishikawa, H. et al. Mass spectrometric and mutational analyses reveal Lys-6-linked polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1

15 ubiquitin ligase. J. Biol. Chem. in press [online resource]に記載の方法で行った^{1,2}。切断変異体を作製するために終止コドンを含む点突然変異を、site-directed mutagenesis 法 (Stratagene)によって生成した。用いた全てのプラスミドは、DNAシーケンスによって確認した。サイクリン及びCDKの哺乳動物発現プラスミドは、Ohta, T., Xiong, Y., Phosphorylation-and Skp1-independent *in vitro*

20 ubiquitination of E2F1 by multiple ROC-cullin ligases. Cancer res.61, 1347-1353 (2001)及びMaeda, I. Ohta, T. Koizumi, H. Fukuda, M. *In vitro* ubiquitination of cyclin D1 by ROC1-CUL1 and ROC1-CUL3. FEBS Lett.494, 181-185(2001)に記載の方法^{26,27}で調製した。

ウサギE1 (Affiniti Research Products)、ウシユビキチン(Sigma)及びFlag-ユビ

25 キチン(Sigma)は市販のものを購入した。His-UbcH5c、並びにHis-BRCA1及びHis-BARD1の切断N-末端断片は、上記のHashizumeらの方法で作製した¹。全長のHis-Flag-NPMは、ニッケルアガロースビーズとそれに続く抗-Flag抗体架橋アガロースビーズを用いた2段階精製を行うことにより得た。精製タンパク質をCoomassie Brilliant Blueで染色し、その濃度を、デンストメーター(LAS 3000,

Fuji film)を用いて標準タンパク質と比較することにより測定した。

細胞培養、発現及び免疫学的手法

細胞を10%ウシ胎仔血清 (293T, HeLa及びCOS7)又は10%新生ウシ血清 (3T3
5 Swiss)及び1%抗生物質・抗真菌剤 (Life Technologies, Inc)を添加したダルベッコ
(Dulbecco)改変Eagle's培地で培養し、Ohta, T., Michel, J. J., Schottelius, A. J.,
& Xiong, Y. ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin
partners with an associated ubiquitin ligase activity. *Mol. Cell* 3, 535-541
(1999)に記載された標準的なリン酸カルシウム沈殿法²⁴を用いて細胞に発現させ
10 た。プロテアソーム阻害剤の効果を調べるために、細胞を、MG132 (20 μ M)、
LLnL (20 μ M)又は等量のDMSO溶剤(1 μ l/ml培地)で細胞回収前に10時間処理し
た。チミジン・ノコダゾールによる細胞周期の同調は、Ohta, T., Michel, J. J., &
Xiong, Y. Association with cullin partners protects ROC proteins from
proteasome-dependent degradation. *Oncogene* 18, 6758-6766 (1999)に記載の
15 方法²⁵で行った。

その後、細胞をpropidium iodideで染色し、FACSCalibur (Becton Dickinson)
を用いたフローサイトメトリーに供した。

*in vivo*でユビキチン化された基質の検出を含む免疫沈降及び免疫ブロット法
は、抗-Flag抗体結合アガロースビーズ(M2, Sigma)からFlag-NPMを製造者の説
20 明書に従って抽出するためにFlagペプチドを用いること以外は、上記した
Hashizumeら及びNishikawaらの方法のとおりである^{1,2}。

*in vitro*ユビキチン化アッセイは、反応にHis-Flag-NPM (0.5 μ g)を加えること
以外は、上記したHashizumeら及びNishikawaらの方法に従って行った^{1,2}。

*in vitro*キナーゼアッセイは、Ohta, T., & Xiong, Y. Phosphorylation- and
25 Skp1-independent *in vitro* ubiquitination of E2F1 by multiple ROC-cullin
ligases. *Cancer Res.* 61, 1347-1353 (2001)に報告したように行った²⁶。免疫沈降
したHA-BARD1の脱リン酸化のため、HA-BARD1を結合させたビーズを、2Uの
ウシ腸管アルカリフォスファターゼ(Takara)とともに37℃で30分間インキュ
ベートした。

また、キナーゼアッセイではCDK2-サイクリンE1又はHA-CDK1-サイクリンB1を発現させた293T細胞から沈降して得た抗-CDK2または抗-HA免疫複合体をキナーゼとして用い、基質タンパク質2 μ gを用いて行った。核分画及び細胞質分画の調製のために、細胞をバッファーA[10 mM MgCl₂、100 mM NaCl、0.5% Triton X-100、2.5 mM MgCl₂、10 mM NaF、及びプロテイナーゼ阻害剤]を用いて4℃で5分間溶解し、26-ゲージ注射針で3回通した。細胞質上清分画は、4,000 \times gで2分間遠心分離を行った後に獲得した。残ったペレットから核分画を得るために、バッファーB[50 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、0.5% NP-40、50 mM NaF、1 mM DTT、1 mM NaVO₃、及びプロテイナーゼ阻害剤]の中で超音波をかけることにより抽出した。

パルス - チェイス分析は、293細胞を[³⁵S]-メチオニンで1時間パルスラベルしたのち追跡した。

質量分析器を用いたスクリーニング

ユビキチン化反応は、上記のNishikawaらの方法²と同様な手順で、Myc-BRCA1 (1-772)及びBARD1を発現する293T細胞から沈降されたプロテインAアガロースビーズに結合した抗-Myc免疫複合体とFlag-ユビキチン、E1、His-UbcH5cを用いて行った。10個の反応液(各30 μ l)から得られた上清を回収して30 μ l容量の抗-Flag抗体架橋ビーズ(Sigma)とともにインキュベートし、Flag-ユビキチンが共有結合したタンパク質を沈降させた。このビーズから、0.1 mg/mlのFlagペプチドを含有する25mM重炭酸アンモニウム30 μ l中にて、Flag-ユビキチン結合タンパク質を抽出し、7.4 μ g/mlトリプシンを用いて30℃で20時間消化した。

もう一つの方法として、HA-BARD1(1-408)と、野生型又は変異体(I26A)Flag-BRCA1 (1-222)のいずれかとの複合体と相互作用するタンパク質を、上記のように免疫沈降して抽出し、SDS-PAGEで分離し、製造者の説明書に従ってSypro Ruby (Molecular Probe)により染色した。目的のバンドをゲルから切り出し、製造者の説明書に従ってIn Gel Digest Kit (Millipore)を用いてトリプシンで消化した。

得られたペプチド断片を上記のNishikawaらの方法²でLC/MS/MSにて解析した

2. 得られた衝突誘起解離スペクトルをMascotソフトウェアで解析した。

間接免疫細胞化学

増殖細胞を3%ホルマリンで15分間固定し、0.2%Triton X-100で5分間浸透した。

- 5 細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、0.5%BSA添加PBSでブロックし、抗-NPM抗体、抗- α/β -チューブリン抗体、抗-BARD1抗体及び抗-BRCA1抗体で染色した。紡錘体極でのBRCA1及びNPMの共在を検出するために、Hsu, L. C, & White RL. BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 12983-12988 (1998)に報告されているように¹⁵、
- 10 細胞を冷メタノールで固定し、0.1% Triton X-100緩衝液で浸透した。1次抗体を、以下の濃度でブロッキング緩衝液中に希釈した：抗-NPM (0.5 μ g/ml)；抗- α/β -チューブリン(1 μ g/ml)；抗-BARD1 (3 μ g/ml)；及び抗-BRCA1(2 μ g/ml)。FITC又はローダミン結合2次抗体(Jackson ImmunoResearch)を1:50に希釈して用いた。核を0.5 μ M TO-PRO-3 (Molecular probe)で対比染色した後、細胞を蛍光マ
- 15 ウント培地(BioLad)でマウントし、共焦点レーザー顕微鏡(LSM 510, Carl Zeiss)で観察した。

〔実施例1〕

- BRCA1-BARD1リガーゼによりユビキチン化された基質の異なる2つのスクリー
- 20 ニングによるNPMの同定

- 第一に、本発明者らは、ユビキチンリガーゼ免疫複合体が基質を含有しうるとの仮説を立てて以下の通りに試験した。すなわち、Flag - ユビキチンが共有結合したタンパク質を、Myc-BRCA1(1-772)-BARD1免疫複合体から、上記したとおりに作製した。反応上清部分を、抗-Flag抗体を用いた免疫ブロット法により分析
- 25 し（図1a左パネル）、残りの部分を用いて、ナノスケールキャピラリー液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析(LC/MS/MS)でポリユビキチン化された生成物を解析した（図1a）。同定されたタンパク質のうち、ヌクレオフォスミン/B23 (NPM)は17個のペプチドを有し、Mowseスコア126で最も高い可能性を示した（表1）。

表 1: 図 1a 及び図 1b におけるスクリーニングにより同定された NPM のペプチド断片

a		b	
5	25 ADKDYHFK (配列番号 4)	74	VTLATLK (配列番号 21)
	33 VDNDENEHQLSLR (配列番号 5)	135	LLSISGK (配列番号 22)
	46 TVSLGAGAK (配列番号 6)	240	GPSSVEDIKAK (配列番号 23)
	74 VTLATLK (配列番号 7)	268	FINYVK (配列番号 24)
	143 SAPGGGSKVPQKK (配列番号 8)		
10	151 VPQK (配列番号 9)		
	198 DTPAKNAQKSNQNGK (配列番号 10)		
	203 NAQKSNQNGKDSK (配列番号 11)		
	213 DSKPSSTPRSK (配列番号 12)		
	216 PSSTPRSKGQESFK (配列番号 13)		
15	224 GQESFK (配列番号 14)		
	230 KQEK (配列番号 15)		
	240 GPSSVEDIK (配列番号 16)		
	251 MQASIEKGGSLPK (配列番号 17)		
	264 VEAQFINYVK (配列番号 18)		
20	268 FINYVKNCFR (配列番号 19)		
	278 MTDQEAIQDLWQWR (配列番号 20)		

第2に、本発明者らは、基質タンパク質がユビキチンリガーゼと一過性に結合し、この結合がリガーゼ活性の失活により安定化されるであろうという仮説を立て、野生型BRCA1-BARD1リガーゼに結合するタンパク質及び触媒作用的に不活性化BRCA1(I26A)-BARD1リガーゼに結合するタンパク質を比較した。すなわち、HA-BARD1 (1-408)と、Flag-BRCA1(1-222)の野生型又はI26A変異体のいずれかとを発現する293T細胞から沈降した抗-Flag免疫複合体をSDS-PAGEにより分離して、Sypro Rubyで染色した。38-40kDa付近に移動するタンパク質(矢印)を消化して、LC/MS/MSに供した。その結果、BRCA1中のI26Aの変異では、BARD1との結合は保持されていたが、UbcH5cとの結合は消失し、BRCA1-BARD1のへ

テロダイマー酵素は触媒作用的には失活した⁹。おおよそ38-40kDaのタンパク質が、変異リガーゼ複合体中のみに高レベルで存在し、LC/MS/MSによってNPMと同定された(図1b及び表1)。従って、異なる2つのスクリーニングにより、同一のタンパク質であるNPMが同定された。

- 5 *in vivo*におけるBRCA1-BARD1とNPM間との結合を、一過性発現させた細胞を用いて、免疫沈降(IP)-ウェスタンブロット解析により確認した(図1c)。すなわち、Myc-BRCA1(1-772)、HA-BARD1及びFlag-NPMのプラスミドを組み合わせ
- 10 て293T細胞に同時に発現させた。全細胞溶解液(図1c 上の2つのパネル)又は免疫沈降物(IP)を、抗-HA/Myc、抗-HA抗体及び抗-Myc抗体を用いた免疫ブロッ
- ト(IB)に供した。抗-HA/Mycは、抗-HA抗体、続いて抗-Myc抗体を再プローブとする免疫ブロット法を表す。NPMとBRCA1-BARD1複合体との*in vivo*における結合は、IP-ウェスタンブロット解析により示した(レーン4)。発現させるときにBRCA1又はBARD1のいずれかを除くと、NPMは消去した(レーン1及び2)。このことは、NPMとの結合は、ヘテロダイマー型BRCA1-BARD1に依存することを
- 15 示す。

- 293T細胞の溶解液をBARD1に対する抗体で免疫沈降させたものを、ウェスタンブロットで解析した。その結果、BARD1免疫複合体におけるBARD1(図1d レーン1、上パネル)及びNPM(同レーン1、下パネル)が検出され、BARD1抗原ペプチド(同レーン2)が特異的に競合することが示された。従って、内因
- 20 性のNPMも、BRCA1-BARD1リガーゼ複合体と物理的に結合し、その基質となることが考えられた。

〔実施例2〕

BRCA1-BARD1によるNPMのユビキチン化の確認

- 25 NPMがBRCA1-BARD1ユビキチンリガーゼの基質か否かを決定するために、293T細胞にFlag-NPMをHA-taggedユビキチン、Myc-BRCA1(1-772)及びBARD1と共発現させた(図2a)。上記発現36時間後に細胞を回収し、1%SDS含有緩衝液中で煮沸した後、0.1%まで希釈し、抗-Flag抗体でFlag-NPMを免疫沈降した。その後、抗-HA抗体(図2a上部)又は抗-Flag抗体(図2a下部)を用いてSDS-PAGE

で分離したNPM沈降物の免疫ブロットを行った。ポリユビキチン化されたNPMはラダー状の特徴を示した(レーン3)。Flag-NPM、HA-ユビキチン、Myc-BRCA1 (1-772)、又はBARD1を除去すると、いずれもNPMのラダーは見られなかったが、これは、BRCA1-BARD1-依存性NPMユビキチン化という考えを裏づける。

- 5 もう一つのRING型E3リガーゼであるMDM2が、公知の基質である癌抑制遺伝子p53のユビキチン化を効率よく促進する¹⁰がことが知られているため、*in vivo* リガーゼアッセイでは、*in vivo*でユビキチン化されたMyc-p53及びFlag-NPMを上記のとおりを検出した。その結果、NPMに対する活性は検出できなかった(図2b、レーン3及び6)。一方、BRCA1-BARD1はp53のユビキチン化をほとんど引き
10 起こさなかった(レーン2)。

- NPMのユビキチン化が過剰発現に起因するNPMのmisfoldingによって引き起こされるという可能性を取り除くために、内因性NPMもまたBRCA1-BARD1によってユビキチン化されるか否かを試験した(図2c)。HA-taggedユビキチンを、Myc-BRCA1 (1-772)及びBARD1とともに293T細胞で共発現させた。ユビキチン
15 化された内因性NPMを1.5 μ gの抗-NPM抗体を用いて293T細胞から免疫沈降し、抗-HA抗体を用いた免疫ブロットによりNPMユビキチン化を解析した。野生型リガーゼを添加すると、ポリユビキチン化されたNPMが検出された(レーン4)。しかし、BRCA1においてI26A変異が置換された場合は、NPMのユビキチン化は消失した。これは、NPMのユビキチン化がBRCA1-BARD1のユビキチンリガーゼ
20 活性に依存することを示している(レーン5)。

- さらにBRCA1-BARD1が*in vitro*でNPMをユビキチン化するか否かをリコンビナントタンパク質のみを用いた*in vitro*のシステムで試験した(図2d)。精製ユビキチン、E1、E2/His-UbcH5c、His-BRCA1(1-304)及びHis-BARD1 (14-189)と大腸菌により精製したHis-Flag-NPM とをATP存在下でインキュベートした。反応物
25 をSDS-PAGEにより分離し、その後、抗-Flag抗体を用いて免疫ブロットを行った。その結果、ゲル上を緩慢に泳動する2つの生成物を検出し得た(レーン7)。基質NPM、ユビキチン、E2/His-UbcH5c、BRCA1又はBARD1を除去すると、全て、このNPMのユビキチン化が消失した。これは、精製システムにおけるBRCA1-BARD1-依存性NPMユビキチン化を示すものである。従って、本発明者らは、

NPMがBRCA1-BARD1 E3ユビキチンリガーゼの基質であると結論した。

〔実施例 3〕

BRCA1-BARD1によるNPMユビキチン化がプロテアソーム分解のシグナルとな

5 りうるか否かの確認

上記のように、本発明者や他の者らは、最近、BRCA1-BARD1が従来とは異なるLys-6結合型ポリユビキチン鎖の形成を触媒することを発見したが、それは、分解の標的とされる代わりに、*in vitro*において、精製26Sプロテアソームにより脱ユビキチン化されるというものである^{2,3}。従って、本発明者らは、BRCA1

10 -BARD1-介在NPMユビキチン化がNPMを分解するための標的とするのか否かを
*in vivo*での安定性を測定することにより試験した(図3)。すなわち、Flag-NPMと
ともにMyc-BRCA1¹⁻⁷⁷²及びHA-BARD1プラスミドを、6ウェルプレート内の
293T細胞に発現させた。1ウェルあたりの全プラスミDNAが2.5 μ gとなるように、
pcDNA 3ベクターを添加して調整した。抗-HA抗体、抗-Flag抗体及び抗- α/β -
15 チューブリン抗体を用いた免疫ブロットにより、各タンパク質の細胞内発現量を
解析した。293T細胞におけるFlag-NPMの定常発現レベルは、BRCA1-BARD1
の共発現により減少することではなく、むしろBRCA1-BARD1の量に依存して増加
した(図3a)。

その後、Flag-NPM、pcDNA3及びMyc-BRCA1/BARD1を発現させた293T細胞
20 をシクロヘキサミド(10 μ M)とともにインキュベートし、4,8,12時間追跡した。
Flag-NPMの細胞内発現量を、抗-Flag抗体を用いた免疫ブロットで解析した。こ
のようなパルスーチェイス分析でもまた、BRCA1-BARD1がNPMを安定化する
ことを裏付けられた(図3b)。

さらに、プロテアソーム阻害剤であるMG132(20 μ M)、LLnL(20 μ M)又は
25 DMSO溶剤のいずれかで10時間処理した細胞から、実施例2で記載したように、
*in vivo*でBRCA1-BARD1-ユビキチン化Flag-NPMを検出した。しかし、ユビキ
チン化Flag-NPM量は増加しなかった(図3c)。これらの知見は、BRCA1-BARD1
によるNPMユビキチン化が、タンパク質分解以外のメカニズムを介してNPMの
機能に影響を与えることを示す。

〔実施例 4〕

分裂期におけるNPMとBRCA1-BARD1との共在及びNPMユビキチン化の確認

BARD1のC末端に対するウサギポリクローナル抗体を調製し、細胞周期の間の細胞内(subcellular)局在及びNPMとの共在を観察するために用いた(図4)。増殖 Swiss 3T3細胞(a)又はCOS7細胞(b、c)を、各々、3%ホルマリン又は冷メタノールで固定した。それらを、抗-NPM抗体、抗- α/β -チューブリン抗体、抗-BARD1抗体及び抗-BRCA1抗体、次いで、FITC (緑) -又はローダミン (赤) -結合 2 次抗体で染色した。核は、TO-PRO-3 (青) で染色した。

- 5 細胞内(subcellular)局在及びNPMとの共在を観察するために用いた(図4)。増殖 Swiss 3T3細胞(a)又はCOS7細胞(b、c)を、各々、3%ホルマリン又は冷メタノールで固定した。それらを、抗-NPM抗体、抗- α/β -チューブリン抗体、抗-BARD1抗体及び抗-BRCA1抗体、次いで、FITC (緑) -又はローダミン (赤) -結合 2 次抗体で染色した。核は、TO-PRO-3 (青) で染色した。
- 10 その結果、間期の細胞では、BARD1は核小体以外の核内に局在し、NPMは核小体に局在し、両者は共在しなかった(図4a、各パネルの左の3つの細胞)。これに対して分裂期の細胞では、NPMはBARD1と共在するが、特に、紡錘体付近に共在した(図4a、各パネル右の1つの細胞)。

- 次に、BRCA1及びNPMが紡錘体極で検出される条件下においてBRCA1及び NPMの局在を観察した(図4b)。BRCA1は紡錘体極でNPMと共在した(図4c)。これは、分裂期におけるBRCA1-BARD1による、細胞周期に依存したBRCA1-BARD1-NPMの相互作用及びNPMの機能調節を示すものである。
- 15 NPMの局在を観察した(図4b)。BRCA1は紡錘体極でNPMと共在した(図4c)。これは、分裂期におけるBRCA1-BARD1による、細胞周期に依存したBRCA1-BARD1-NPMの相互作用及びNPMの機能調節を示すものである。

- さらに、分裂期におけるBRCA1-BARD1とNPMとの結合が細胞周期に依存したNPMユビキチン化と相関するか否かを検討するため、HeLa細胞をチミジン-ノコダゾール処理によってG2/M移行期に同調させた。その後、0.5, 1, 2, 4時間後に細胞周期に再導入し、続いて、G1期に移行させた(図4d)。細胞周期の同調はフローサイトメトリーでモニターし、同調させた細胞を1%SDSバッファー中で煮沸し、希釈し、1.5 μ g/mlの抗-NPM抗体で免疫沈降した後、抗-ユビキチン抗体で免疫ブロットを行った。免疫ブロットの前にニトロセルロース膜を煮沸して、抗体認識の感度を上げた。このように、*in vivo*でのNPMユビキチン化をIP-ウェスタン解析により評価した。NPMユビキチン化は、細胞を分裂期停止から解除した後すぐ(0.5時間及び1時間の時点)に検出されたが、分裂期で停止した細胞、又はG1期の細胞では見られなかった。
- 20 ノコダゾール処理によってG2/M移行期に同調させた。その後、0.5, 1, 2, 4時間後に細胞周期に再導入し、続いて、G1期に移行させた(図4d)。細胞周期の同調はフローサイトメトリーでモニターし、同調させた細胞を1%SDSバッファー中で煮沸し、希釈し、1.5 μ g/mlの抗-NPM抗体で免疫沈降した後、抗-ユビキチン抗体で免疫ブロットを行った。免疫ブロットの前にニトロセルロース膜を煮沸して、抗体認識の感度を上げた。このように、*in vivo*でのNPMユビキチン化をIP-ウェスタン解析により評価した。NPMユビキチン化は、細胞を分裂期停止から解除した後すぐ(0.5時間及び1時間の時点)に検出されたが、分裂期で停止した細胞、又はG1期の細胞では見られなかった。
- 25 認識の感度を上げた。このように、*in vivo*でのNPMユビキチン化をIP-ウェスタン解析により評価した。NPMユビキチン化は、細胞を分裂期停止から解除した後すぐ(0.5時間及び1時間の時点)に検出されたが、分裂期で停止した細胞、又はG1期の細胞では見られなかった。

〔実施例 5〕

BARD1のNH₂末端でのCDK 1/2 によるリン酸化の検討

本発明者らは、BARD1がCDKでリン酸化されるか否かを検討するため、CDK/サイクリンの共発現によって、BARD1の分子量が変動するかを試験した。すなわ

5 ち、Myc-BRCA1¹⁻⁷⁷²及びHA-BARD1のNH₂末端(1-320)断片かCOOH末端

(411-777)断片を293T細胞にCDK-サイクリンあるいはpcDNA3ベクターと共発現させた。その結果、HA-BARD1⁴¹¹⁻⁷⁷⁷ (BARD1のCOOH末端断片411-777) を、

CDK/サイクリンと共発現させても変化がなかったにもかかわらず、HA-BARD1¹⁻³²⁰ (BARD1のNH₂末端断片1-320) を、CDK/サイクリンと共発現させると、ゲ

10 ル上でタンパク質の緩慢な移動が見られた(図6A)。HA-BARD1¹⁻³²⁰を免疫ブロットをすると、少なくとも3つの生成物が得られた(図6 A、B、D矢印)。

HA-BARD1¹⁻³²⁰を免疫沈降し、抗-HA抗体で免疫ブロットした。アガロースビーズで固定したHA-BARD1¹⁻³²⁰をアルカリフォスファターゼ(AP+)で、又はバッ

15 ファーのみ(-)でインキュベートした。その結果、上記3つの生成物は、アルカリフォスファターゼ処理をすると消失した(図6 B)。これにより、3つの生成物は、BARD1のリン酸化物であることが示された。次に、発明者らは、前記キナー

ゼが、BARD1を直接リン酸化するか否かを検討するために、BARD1の精製組換えNH₂末端断片が*in vitro*でCDKの基質となりうるか検討した。精製組換えGST

(図6C、レーン 1、4、7) His-BARD1¹⁴⁻¹⁸⁹ (レーン2、5、8) 及びHis-BARD1¹⁻³²⁰

20 (レーン3、6、9) をSDS-PAGEで分離し、Coomassie Brilliant Blueで染色するか(CBB、左)、または[γ -³²P] ATP及び、CDK2-サイクリンE1 (レーン4 - 6) か

又はCDK 1-サイクリンB1 (レーン7 - 9) とインキュベートした。タンパク質をSDS-PAGEにより分離して、オートラジオグラフィーで解析した。その結果、

His-BARD¹⁴⁻¹⁸⁰もHA-BARD1¹⁻³²⁰も共に、*in vitro*でCDK 2-サイクリンE1及び、

25 CDK 1-サイクリンB 1によりリン酸化された(図6 C)。

HA-BARD1¹⁻³²⁰の*in vivo*での移動シフトの結果と同様、*in vitro*でリン酸化されたHA-BARD1¹⁻³²⁰でもいくつかのバンドが示され、HA-BARD1¹⁻³²⁰の断片に1以上のリン酸化部位があることが示された。精製されたBARD1を*in vitro*でリン酸化する能力は、BRCA1が前記キナーゼが相互作用するためには特に必要ではな

いことを意味する。この考えを裏付けるものとして、BRCA1の共発現は、*in vivo*でのBARD1のリン酸化の量には影響しない。本発明者らは、変異解析によりBARD1中に4つのリン酸化部位をマッピングし、BARD1 S148A/S251A/S288A/T299Aという変異体を同定したが、これらは、CDK2-サイクリンE1（図 6 D）でもCDK1-サイクリンB1でもほとんど分子量の変動を示さなかった。これらの結果から、BARD1は、NH₂末端で、BRCA1-BARD1のヘテロダイマー形成とは独立した態様でCDK1及びCDK2によりリン酸化されることが示された。

〔実施例 6〕

10 細胞周期依存的なBRCA1-BARD1によるNPMユビキチン化の原因となる分子メカニズムの解明

本発明者らは、次に、分裂期のみBRCA1-BARD1によってNPMユビキチン化が起こる原因となる分子メカニズムを解明することを試みた。NPMがG1/S移行期でCDK2-サイクリンEによりリン酸化され、その結果、中心体からNPMが解離して中心体を娘中心小体に分割させることが報告されている^{7,8}。S期の間、NPMは中心体と結合できないが、その間、娘中心小体が中心体、それに続いて2つの紡錘体極に成熟する。本発明者らは、NPMは、中心体複製の間、CDK2-サイクリンE1のリン酸化により調節されるため、CDK2がBRCA1-BARD1リガーゼによるNPMユビキチン化に影響を及ぼすか否かを検討した。293T細胞にMyc-
BRCA1 (1-772)、BARD1、Flag-NPM及びHA-taggedユビキチンを発現させた。
BRCA1-BARD1により、*in vivo*でユビキチン化された生成物を、実施例 2 に記載したように検出した。CDK-サイクリンを共発現させた。驚くべきことに、CDK2-サイクリンE及びCDK2-サイクリンAは、ともに、*in vivo*でBRCA1-BARD1によるNPMユビキチン化を完全に抑制した(図7A、レーン3及び4)。同一のアッセイにおいて、CDK1-サイクリンBは、BRCA1-BARD1によるNPMユビキチン化を干渉し得なかったが(レーン5)、これは、BRCA1-BARD1リガーゼ活性の抑制においてCDK2の特異的な機能を示す。

〔実施例 7〕

CDK2のBRCA1-BARD1のユビキチンリガーゼ活性の抑制

本発明者らは、2つのモデルを区別するために、まず、BRCA1-BARD1リガーゼが、CDK2リン酸化部位がない変異体であるNPM(T199A)をユビキチン化するか否かを試験した⁸(図7B)。手順は実施例6に従って行った。CDK-サイクリン
5 を共発現させ、野生型の代わりにFlag-NPMのリン酸化部位変異体を用いた。NPM(T199A)は、BRCA1-BARD1リガーゼによってユビキチン化され(レーン1)、このユビキチン化はCDK2によって抑制された(レーン2)。従って、CDK2によるNPMユビキチン化の抑制がNPMリン酸化に起因するものではないことが示された。

10 次に本発明者らは、BRCA1自己ユビキチン化を測定することにより、BRCA1-BARD1ヘテロダイマー固有のリガーゼ活性に対する、CDK2-サイクリンE及びCDK2-サイクリンAの効果を試験した。手順は実施例6に従って行った。CDK-サイクリンを共発現させ自己ユビキチン化されたMyc-BRCA1を検出するための免疫沈降には抗-Myc抗体を用いて行った。CDK1-サイクリンBがBRCA1の自己ユ
15 ビキチン化を抑制しなかったのに対し、CDK2-サイクリンE及びCDK2-サイクリンAはともにBRCA1の自己ユビキチン化を完全に抑制した(図7C)。以上の結果から、CDK2-サイクリンE及びCDK2-サイクリンAがBARD1をリン酸化し、NPMを含む基質に対するBRCA1-BARD1リガーゼ活性を抑制することが示された。

BARD1はCDK2-サイクリンE1の基質なので、BRCA1-BARD1ユビキチンリ
20 ガーゼ活性の抑制は、BARD1のリン酸化に直接の影響を与えうる。しかし、BARD1の非リン酸化変異体である、BARD1 S148A/ S288 A/ T299Aを介したBRCA1の自己ユビキチン化も、CDK2-サイクリンE1によって抑制される(図7D)。

BARD1の上記非リン酸化変異体はCDK2によるユビキチンリガーゼ活性の抑制に感受性を有したままであるし、CDK1がCDK2と同じ部位でBARD1をリン酸
25 化しても、BRCA1-BARD1のリガーゼ活性は抑制されないため、リン酸化自体は、BRCA1-BARD1ユビキチンリガーゼのダウンレギュレーションにそれほど重要ではないと考えられる。

〔実施例8〕

CDK2がBRCA1及びBARD1のタンパク質発現レベルに与える影響の検討

発明者らは、CDK2がBRCA1及びBARD1のタンパク質発現レベルに影響を与えるかどうかを試験した。すなわち、293T細胞にMyc-BRCA1¹⁻⁷⁷²、HA-BARD1を発現させて、抗-HA抗体、続いて抗-Myc抗体を再プローブとする免疫ブロット
5 法を行ったところ、ユビキチンリガーゼ活性と対応して、BRCA1及びBARD1のどちらの定常状態レベルも、CDK1・サイクリンB1ではなく（図8Aレーン5）、CDK2・サイクリンE1/A1により劇的に減少した（図8Aレーン3及び4）。また、60mmのディッシュ中の293T細胞に、CDK2・サイクリンE1量を0.1、0.5及び1.5
10 μg としたものを、Myc-BRCA1¹⁻⁷⁷²、HA-BARD1をコードするプラスミドを各々1 μg とともに発現させて、各々のタンパク質の定常状態を、抗-HA抗体、抗-Flag抗体、抗-Mycを用いた免疫ブロットで解析した。その結果、BRCA1及びBARD1のどちらの定常状態レベルも、用量依存的に減少した（図8B）。CDK1・サイクリンB1ではBRCA1-BARD1の安定性に変化はないが、これは細胞中にキナーゼ活性がないためではない。なぜならば、BARD1のリン酸化が明らかに検出されているか
15 らである（図8Aレーン5）。

さらに、Myc-BRCA1¹⁻⁷⁷²、HA-BARD1及び親pcDNA3ベクター（上段）又はCDK2・サイクリンE1（下段）を発現させた293T細胞を³⁵S-メチオニンでパルス
・チェイス試験した。その後、細胞溶解液を抗-Myc抗体で免疫沈降し、SDS-PAGEにより分離して、オートラジオグラフィーで解析したところ、CDK2・サイクリン
20 E1の共発現で細胞中のBRCA1-BARD1複合体の半減期は、顕著に減少した（4-6時間から2時間以下まで：図8C）。これより、発現の減少はタンパク質の分解によるものであることが示された。

〔実施例9〕

25 CDK2・サイクリンE1によるBRCA1及びBARD1の細胞質への輸送

BRCA1及びBARD1は、核から細胞質への輸送により分解されるという報告があった。発明者らは、CDK2・サイクリンE1をBRCA1と共発現させ、CDK2・サイクリンE1が、BRCA1との局在に影響を与えるのかどうかを試験した。293T細胞をFLAG-BRCA1、HA-BARD1及び親pcDNA3ベクター又はCDK2・サイクリンE1

で一過性発現させた。細胞質BRCA1の分解を防ぐために、細胞回収6時間前にプロテアソーム阻害剤であるcarbobenzoxyl-leucinyll-leucinyll-leucinal (MG132)を細胞に添加した。核および細胞質中のBRCA 1 タンパク質レベルを定量するために、細胞を核 (N) プール及び細胞質 (C) プールに分画した後、免疫ブロットした。CDK2-サイクリンE1が存在しない場合、細胞質のBRCA1のタンパク質レベルは、核で観察されるタンパク質レベルよりも低い (図8D、上段、レーン1及び2)。CDK2-サイクリンE1の共発現において、細胞質BRCA1タンパク質のレベルは、核で見られるタンパク質レベルを超えていた (図8D、上から2段目、レーン3及び4)。これらの結果より、CDK2-サイクリンE1の共発現により、BRCA1が核から細胞質へ輸送されることが考えられた。

〔実施例10〕

BARD1 の細胞周期に依存した発現

BARD1 が細胞周期のなかでどのように発現されるのかを調べるために以下の試験を行った。HeLa 細胞を2重チミジン阻害(A)を行ってG₁/S移行期に同調させた。また、チミジン-ノコダゾール阻害(B)を行って分裂期に同調させた。阻害を解除した後の細胞周期の経過をFACS分析でモニターした。また、細胞は、解除後適当な時間に抗体で免疫ブロットすることにより解析した。その結果、BARD1 の発現レベルは、分裂期で最も高く、緩慢な移動バンドが見られ (図5Aレーン8、bレーン1~3)、BRCA1 及びサイクリン B1 の発現増強の時期に一致した。M/G₁移行期に BARD1 は2つのバンドに分かれ (図5Aレーン9、bレーン4)、細胞がG₁期に入ると優勢な迅速なバンドに移行した (図5Aレーン10、bレーン5)。これに同調して、BRCA1 及びサイクリン B1 は消失した。BARD1 の発現レベルはG₁期及びS期でダウンレギュレーションされ、特に、サイクリン E1 が発現されるG₁後期 (図5Aレーン2、bレーン8) からは顕著にダウンレギュレーションされた。

以下の参考文献は、参照として本明細書の全体に組み込まれる。

参考文献

1. Hashizume, R. et al. The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin
ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J. Biol. Chem.* 276,
14537-14540 (2001).
2. Nishikawa, H. et al. Mass spectrometric and mutational analyses reveal
5 Lys-6-linked polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. *J.*
Biol. Chem. in press [online resource]
<http://www.jbc.org/cgi/reprint/M308540200v1> (2003).
3. Wu Baer, F., Lagrazon, K., Yuan, W., & Baer, R. The BRCA1/BARD1
heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage
10 involving lysine residue K6 of ubiquitin. *J. Biol. Chem.* 278, 34743-34746 (2003).
4. Baer, R., & Ludwig, T. The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor
suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity. *Curr. Opin. Genet. Dev.*
12, 86-91 (2002).
5. Venkitaraman, A. R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and
15 BRCA2. *Cell* 108, 171-182 (2002).
6. Deng, C. X. Roles of BRCA1 in centrosome duplication. *Oncogene* 21,
6222-6227 (2002).
7. Okuda, M. *et al.* Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in
centrosome duplication. *Cell* 103, 127-140 (2000).
- 20 8. Tokuyama, Y. *et al.* Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199)
by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication.
J. Biol. Chem. 276, 21529-21537 (2001).
9. Brzovic, P. S. *et al.* Binding and recognition in the assembly of an active
BRCA1/BARD1 ubiquitin-ligase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100,
25 5646-5651 (2003).
10. Honda, R., Tanaka, H., & Yasuda, H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase
E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* 420, 25-27 (1997).
11. Hershko, A., & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*
67, 425-479 (1998).

12. Pickart, C. M. Ubiquitin enters the new millennium. *Mol. Cell* 8, 499-504 (2001).
13. Xu, X. *et al.* Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol. Cell* 3, 389-395 (1999).
14. Weaver, Z. *et al.* Mammary tumors in mice conditionally mutant for Brca1 exhibit gross genomic instability and centrosome amplification yet display a recurring distribution of genomic imbalances that is similar to human breast cancer. *Oncogene* 21, 5097-5107 (2002).
15. Hsu, L. C. & White RL. BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 12983-12988 (1998).
16. Hsu, L. C., Doan, T. P., & White, R. L. Identification of a gamma-tubulin-binding domain in BRCA1. *Cancer Res.* 61, 7713-7718 (2001).
17. Zatsepina, O. V. *et al.* The nucleolar phosphoprotein B23 redistributes in part to the spindle poles during mitosis. *J. Cell. Sci.* 112, 455-466 (1999).
18. Wu, M. H. & Yung, B. Y. UV stimulation of nucleophosmin/B23 expression is an immediate-early gene response induced by damaged DNA. *J. Biol. Chem.* 277, 48234-48240 (2002).
19. Tawfic, S., Olson, M. O., & Ahmed, K. Role of protein phosphorylation in post-translational regulation of protein B23 during programmed cell death in the prostate gland. *J. Biol. Chem.* 270, 21009-21015 (1995).
20. Pang, Q. *et al.* Nucleophosmin interacts with and inhibits the catalytic function of eukaryotic initiation factor 2 kinase PKR. *J. Biol. Chem.* 278, 41709-41717 (2003).
21. Okuwaki, M., Iwamatsu, A., Tsujimoto, M., & Nagata, K. Identification of nucleophosmin/B23, an acidic nucleolar protein, as a stimulatory factor for *in vitro* replication of adenovirus DNA complexed with viral basic core proteins. *J. Mol. Biol.* 311, 41-55 (2001).
22. Okuwaki, M., Matsumoto, K., Tsujimoto, M., & Nagata, K. Function of

nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett.* 506, 272-276 (2001).

23. Keyomarsi, K. *et al.* Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 347, 1566-1575 (2002).

5 24. Ohta, T., Michel, J. J., Schottelius, A. J., & Xiong, Y. ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity. *Mol. Cell* 3, 535-541 (1999).

25. Ohta, T., Michel, J. J., & Xiong, Y. Association with cullin partners protects ROC proteins from proteasome-dependent degradation. *Oncogene* 18, 6758-6766
10 (1999).

26. Ohta, T., & Xiong, Y. Phosphorylation- and Skp1-independent *in vitro* ubiquitination of E2F1 by multiple ROC-cullin ligases. *Cancer Res.* 61, 1347-1353 (2001).

27. Maeda, I. Ohta, T. Koizumi, H. Fukuda, M. *In vitro* ubiquitination of cyclin
15 D1 by ROC1-CUL1 and ROC1-CUL3. *FEBS Lett.* 494, 181-185(2001).

配列表フリーテキスト

配列番号 3 : プライマー

請 求 の 範 囲

1. ヌクレオフォスミンをBRCA1-BARD1と反応させることを含む、ヌクレオ
フォスミンをポリユビキチン化する方法。
- 5 2. ヌクレオフォスミンをポリユビキチン化することを含む、ヌクレオフォスミ
ンを安定化させる方法。
3. ポリユビキチン化が*in vitro*又は*in vivo*で行われるものである、請求項 1 ま
たは 2 記載の方法。
4. CDK2-サイクリンE及び／又はCDK2-サイクリンAを用いてBARD1をリン酸
10 化することを含む、ヌクレオフォスミンのポリユビキチン化を抑制する方法。
5. CDK2-サイクリンE及び／又はCDK2-サイクリンAを用いてBARD1をリン酸
化することを含む、BRCA1-BARD1を分解及び／又は解離させる方法。
6. CDK2-サイクリンE及び／又はCDK2-サイクリンAを用いてBARD1をリン酸
15 化することを含む、BRCA1-BARD1のユビキチンリガーゼ活性を不活化する
方法。
7. BARD1のリン酸化部位がS148、S251、S288及びT299からなる群から選ば
れる少なくとも 3 つの部位である、請求項 4 ～ 6 のいずれか 1 項記載の方法。
8. BARD1のリン酸化部位がS148、S288及びT299である、請求項 4 ～ 6 のい
ずれか 1 項記載の方法。
- 20 9. BARD1のリン酸化部位がS148、S251、S288及びT299である、請求項 4 ～
6 のいずれか 1 項記載の方法。
10. BRCA1並びにCDK2-サイクリンE及び／又はCDK2-サイクリンAを共発現
させることを含む、BRCA1を核から細胞質へ輸送させる方法。

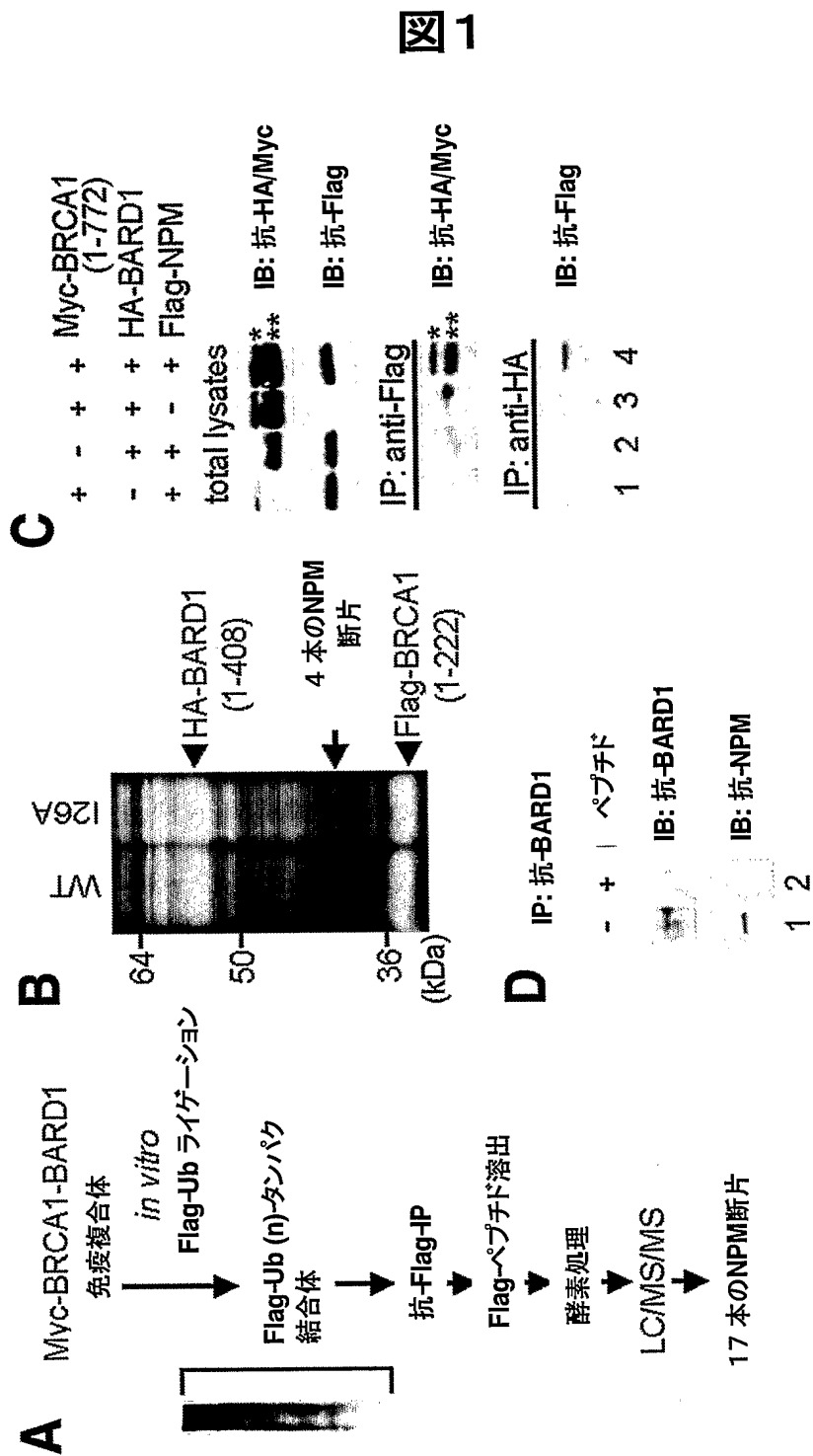


图2

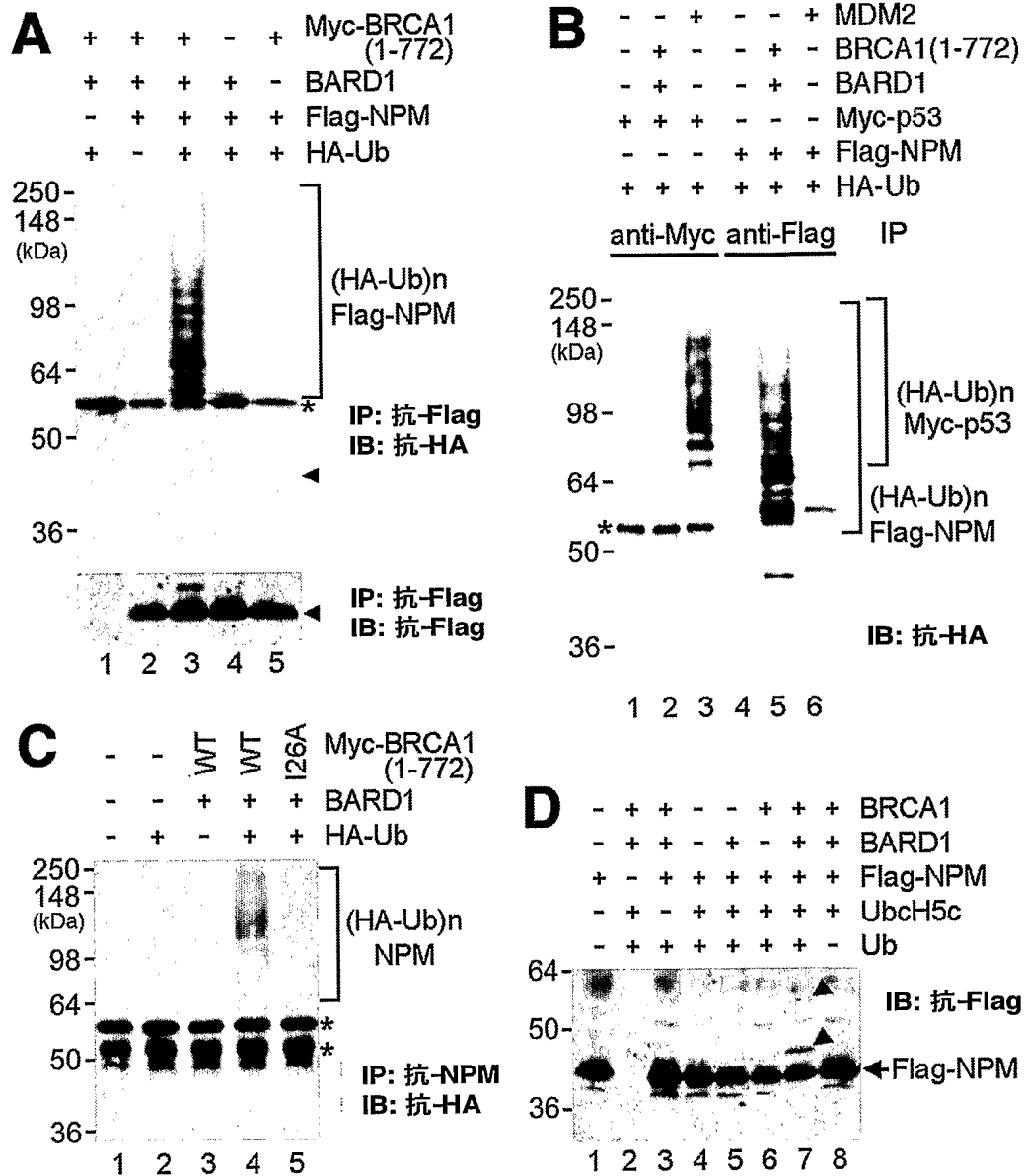


图 3

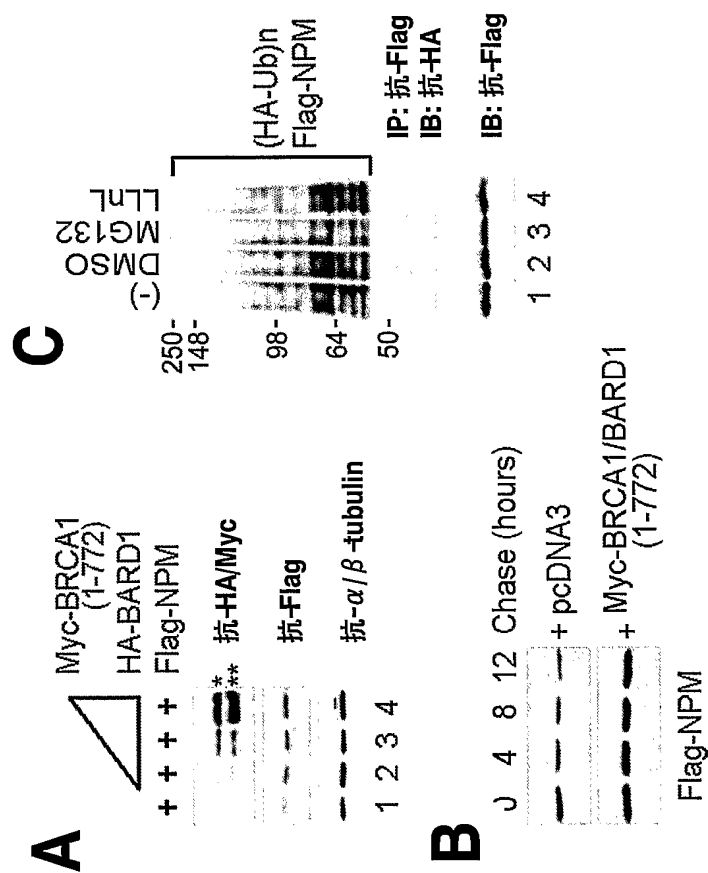


図4

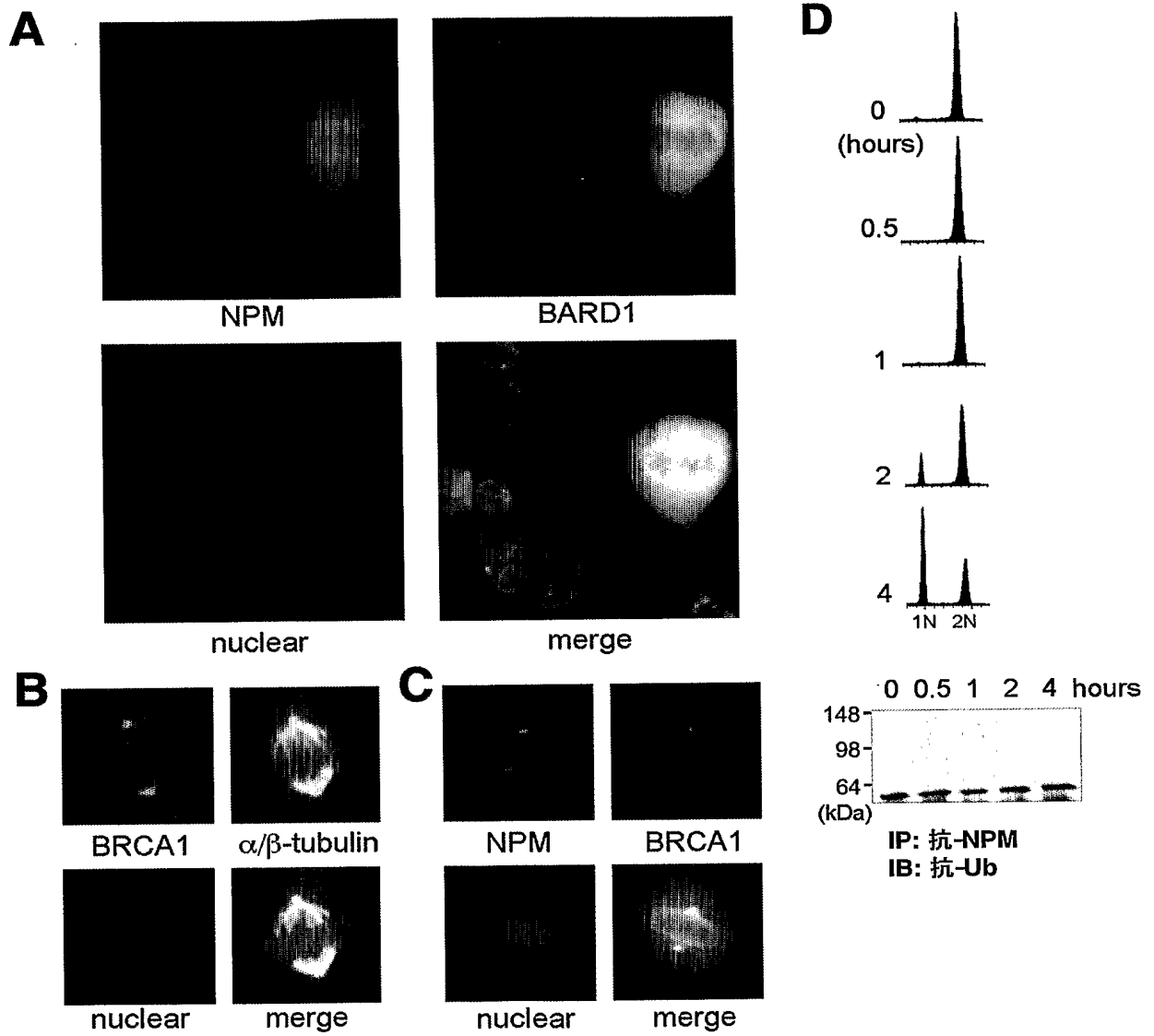
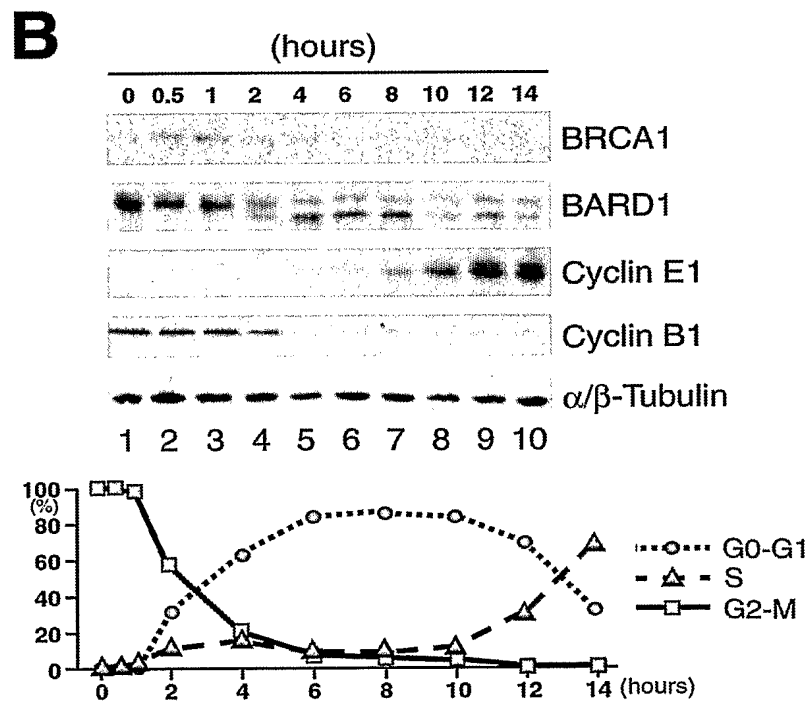
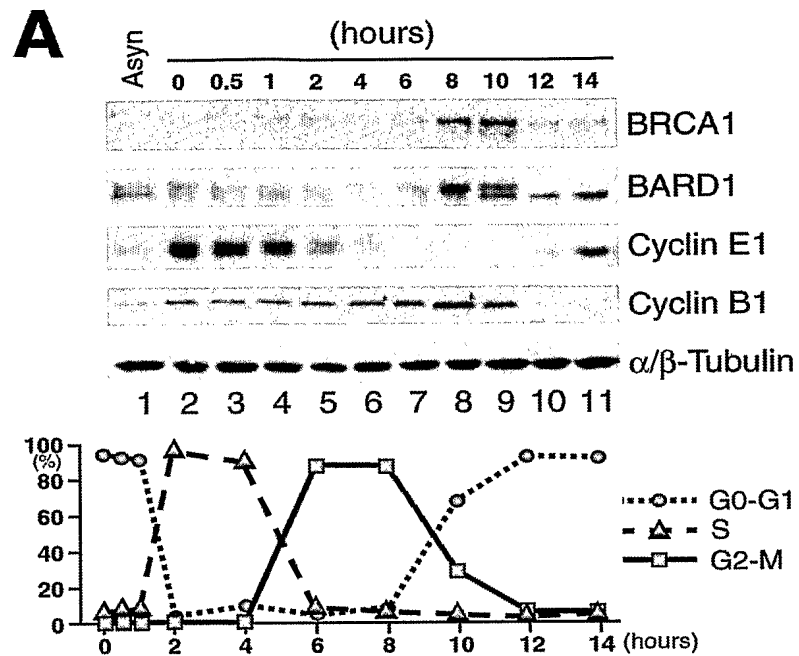


図5



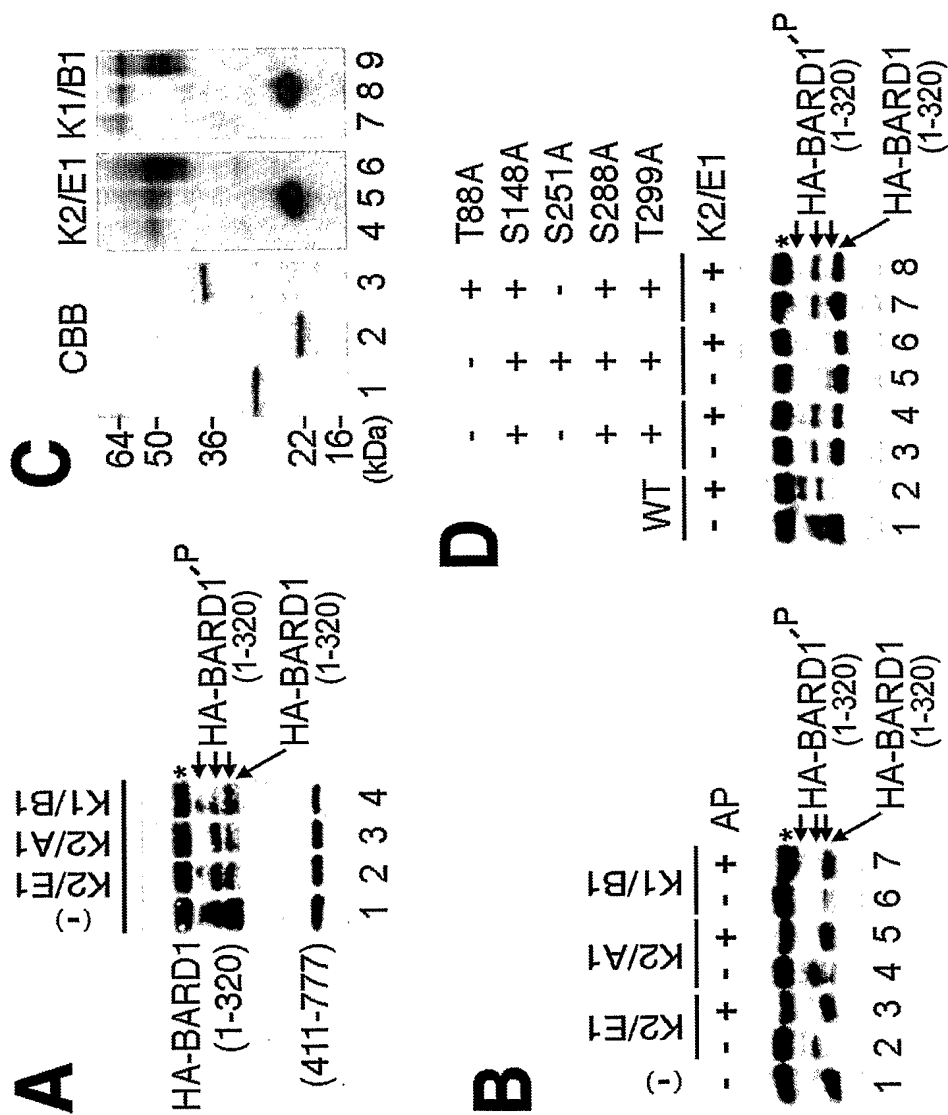


図7

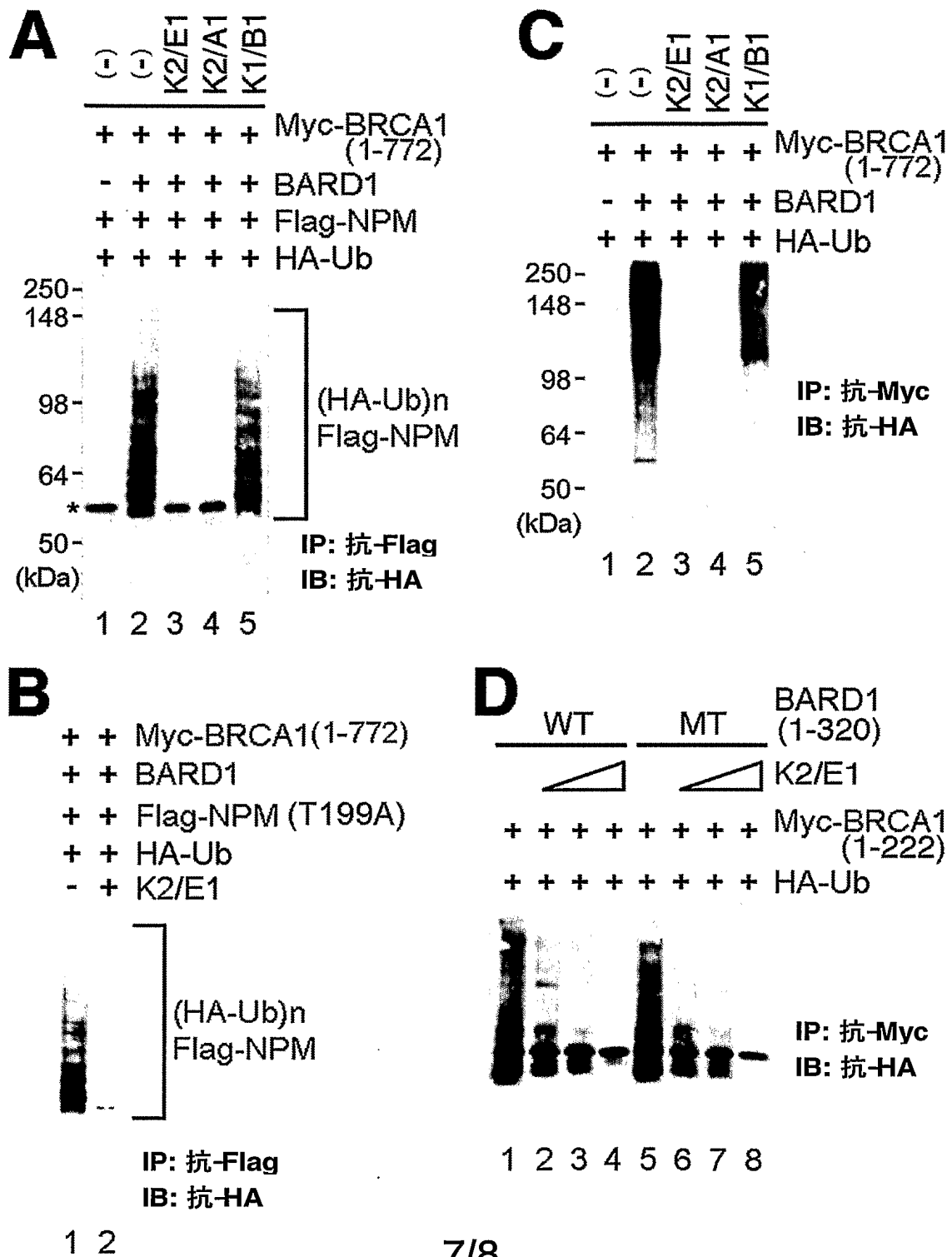
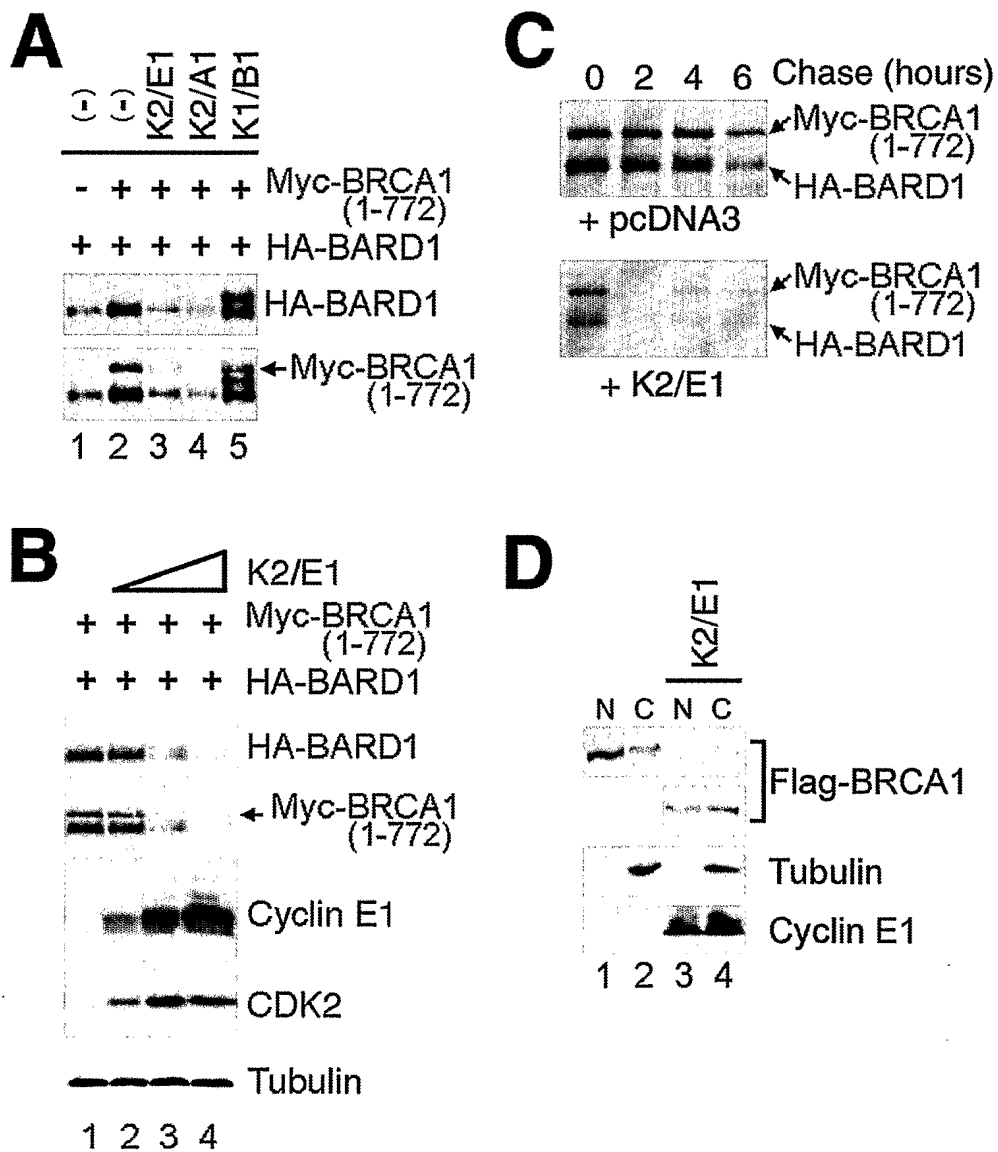


図8



SEQUENCE LISTING

<110> Locomogene, Inc.,
 St. Marianna University School of Medicine
 Ohta, Tomohiko

<120> Method for inhibiting a tumor using a BRCA1-BARD1 passway

<130> PCT05-0001

<150> US60/541287

<151> 2004-02-02

<160> 24

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1333

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (101)..(985)

<400> 1

ggggccctgg tgtgattccg tctgcgcggt ttgttctctg gagcagcggt cttttatctc 60

cgtcgcgctt ctctcctacc taagtgcgtg ccgccacccg atg gaa gat tcg atg 115

Met Glu Asp Ser Met

1 5

gac atg gac atg agc ccc ctg agg ccc cag aac tat ctt ttc ggt tgt 163

Asp Met Asp Met Ser Pro Leu Arg Pro Gln Asn Tyr Leu Phe Gly Cys

10	15	20	
gaa cta aag gcc gac aaa gat tat cac ttt aag gtg gat aat gat gaa			211
Glu Leu Lys Ala Asp Lys Asp Tyr His Phe Lys Val Asp Asn Asp Glu			
25	30	35	
aat gag cac cag tta tct tta aga acg gtc agt tta ggg gct ggt gca			259
Asn Glu His Gln Leu Ser Leu Arg Thr Val Ser Leu Gly Ala Gly Ala			
40	45	50	
aag gat gag ttg cac att gtt gaa gca gag gca atg aat tac gaa ggc			307
Lys Asp Glu Leu His Ile Val Glu Ala Glu Ala Met Asn Tyr Glu Gly			
55	60	65	
agt cca att aaa gta aca ctg gca act ttg aaa atg tct gta cag cca			355
Ser Pro Ile Lys Val Thr Leu Ala Thr Leu Lys Met Ser Val Gln Pro			
70	75	80	85
acg gtt tcc ctt ggg ggc ttt gaa ata aca cca cca gtg gtc tta agg			403
Thr Val Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ile Thr Pro Pro Val Val Leu Arg			
90	95	100	
ttg aag tgt ggt tca ggg cca gtg cat att agt gga cag cac tta gta			451
Leu Lys Cys Gly Ser Gly Pro Val His Ile Ser Gly Gln His Leu Val			
105	110	115	
gct gtg gag gaa gat gca gag tca gaa gat gaa gag gag gag gat gtg			499
Ala Val Glu Glu Asp Ala Glu Ser Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp Val			
120	125	130	
aaa ctc tta agt ata tct gga aag cgg tct gcc cct gga ggt ggt agc			547
Lys Leu Leu Ser Ile Ser Gly Lys Arg Ser Ala Pro Gly Gly Gly Ser			
135	140	145	
aag gtt cca cag aaa aaa gta aaa ctt gct gct gat gaa gat gat gac			595
Lys Val Pro Gln Lys Lys Val Lys Leu Ala Ala Asp Glu Asp Asp Asp			

150	155	160	165	
gat gat gat gaa gag gat gat gat gaa gat gat gat gat gat gat ttt				643
Asp Asp Asp Glu Glu Asp Asp Asp Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp Phe				
	170	175	180	
gat gat gag gaa gct gaa gaa aaa gcg cca gtg aag aaa tct ata cga				691
Asp Asp Glu Glu Ala Glu Glu Lys Ala Pro Val Lys Lys Ser Ile Arg				
	185	190	195	
gat act cca gcc aaa aat gca caa aag tca aat cag aat gga aaa gac				739
Asp Thr Pro Ala Lys Asn Ala Gln Lys Ser Asn Gln Asn Gly Lys Asp				
	200	205	210	
tca aaa cca tca tca aca cca aga tca aaa gga caa gaa tcc ttc aag				787
Ser Lys Pro Ser Ser Thr Pro Arg Ser Lys Gly Gln Glu Ser Phe Lys				
	215	220	225	
aaa cag gaa aaa act cct aaa aca cca aaa gga cct agt tct gta gaa				835
Lys Gln Glu Lys Thr Pro Lys Thr Pro Lys Gly Pro Ser Ser Val Glu				
230	235	240	245	
gac att aaa gca aaa atg caa gca agt ata gaa aaa ggt ggt tct ctt				883
Asp Ile Lys Ala Lys Met Gln Ala Ser Ile Glu Lys Gly Gly Ser Leu				
	250	255	260	
ccc aaa gtg gaa gcc aaa ttc atc aat tat gtg aag aat tgc ttc cgg				931
Pro Lys Val Glu Ala Lys Phe Ile Asn Tyr Val Lys Asn Cys Phe Arg				
	265	270	275	
atg act gac caa gag gct att caa gat ctc tgg cag tgg agg aag tct				979
Met Thr Asp Gln Glu Ala Ile Gln Asp Leu Trp Gln Trp Arg Lys Ser				
	280	285	290	
ctt taa gaaaatagtt taaacaattt gttaaaaaat tttccgtctt atttcatttc				1035
Leu				

tgtaacagtt gatatctggc tgcctttttt ataatgcaga gtgagaactt tccctaccgt 1095
 gtttgataaa tgttgtccag gttctattgc caagaatgtg ttgtccaaaa tgcctgttta 1155
 gtttttaaag atggaactcc accctttgct tggttttaag tatgtatgga atgttatgat 1215
 aggacatagt agtagcgggtg gtcagacatg gaaatgggtg ggagacaaaa atatacatgt 1275
 gaaataaaac tcagtatttt aataaaataa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1333

<210> 2
 <211> 294
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Asp Ser Met Asp Met Asp Met Ser Pro Leu Arg Pro Gln Asn
 1 5 10 15

Tyr Leu Phe Gly Cys Glu Leu Lys Ala Asp Lys Asp Tyr His Phe Lys
 20 25 30

Val Asp Asn Asp Glu Asn Glu His Gln Leu Ser Leu Arg Thr Val Ser
 35 40 45

Leu Gly Ala Gly Ala Lys Asp Glu Leu His Ile Val Glu Ala Glu Ala
 50 55 60

Met Asn Tyr Glu Gly Ser Pro Ile Lys Val Thr Leu Ala Thr Leu Lys
65 70 75 80

Met Ser Val Gln Pro Thr Val Ser Leu Gly Gly Phe Glu Ile Thr Pro
 85 90 95

Pro Val Val Leu Arg Leu Lys Cys Gly Ser Gly Pro Val His Ile Ser
 100 105 110

Gly Gln His Leu Val Ala Val Glu Glu Asp Ala Glu Ser Glu Asp Glu
 115 120 125

Glu Glu Glu Asp Val Lys Leu Leu Ser Ile Ser Gly Lys Arg Ser Ala
 130 135 140

Pro Gly Gly Gly Ser Lys Val Pro Gln Lys Lys Val Lys Leu Ala Ala
145 150 155 160

Asp Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp Glu Glu Asp Asp Asp Glu Asp Asp
 165 170 175

Asp Asp Asp Asp Phe Asp Asp Glu Glu Ala Glu Glu Lys Ala Pro Val
 180 185 190

Lys Lys Ser Ile Arg Asp Thr Pro Ala Lys Asn Ala Gln Lys Ser Asn
 195 200 205

Gln Asn Gly Lys Asp Ser Lys Pro Ser Ser Thr Pro Arg Ser Lys Gly .
 210 215 220

Gln Glu Ser Phe Lys Lys Gln Glu Lys Thr Pro Lys Thr Pro Lys Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Ser Val Glu Asp Ile Lys Ala Lys Met Gln Ala Ser Ile Glu
 245 250 255

Lys Gly Gly Ser Leu Pro Lys Val Glu Ala Lys Phe Ile Asn Tyr Val
 260 265 270

Lys Asn Cys Phe Arg Met Thr Asp Gln Glu Ala Ile Gln Asp Leu Trp
 275 280 285

Gln Trp Arg Lys Ser Leu
 290

<210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 3

Cys Val Met Ser Phe Glu Leu Leu Pro Leu Asp Ser
 1 5 10

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Asp Lys Asp Tyr His Phe Lys
1 5

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Val Asp Asn Asp Glu Asn Glu His Gln Leu Ser Leu Arg
1 5 10

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Thr Val Ser Leu Gly Ala Gly Ala Lys
1 5

<210> 7

<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Val Thr Leu Ala Thr Leu Lys
1 5

<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Ser Ala Pro Gly Gly Gly Ser Lys Val Pro Gln Lys Lys
1 5 10

<210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Val Pro Gln Lys
1

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Asp Thr Pro Ala Lys Asn Ala Gln Lys Ser Asn Gln Asn Gly Lys
1 5 10 15

<210> 11

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Asn Ala Gln Lys Ser Asn Gln Asn Gly Lys Asp Ser Lys
1 5 10

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Ser Lys Pro Ser Ser Thr Pro Arg Ser Lys
1 5 10

<210> 13

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Pro Ser Ser Thr Pro Arg Ser Lys Gly Gln Glu Ser Phe Lys
1 5 10

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Gly Gln Glu Ser Phe Lys
1 5

<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Lys Gln Glu Lys
1

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Gly Pro Ser Ser Val Glu Asp Ile Lys
1 5

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Gln Ala Ser Ile Glu Lys Gly Gly Ser Leu Pro Lys

1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Val Glu Ala Lys Phe Ile Asn Tyr Val Lys

1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Phe Ile Asn Tyr Val Lys Asn Cys Phe Arg

1 5 10

<210> 20

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Thr Asp Gln Glu Ala Ile Gln Asp Leu Trp Gln Trp Arg
1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Val Thr Leu Ala Thr Leu Lys
1 5

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Leu Leu Ser Ile Ser Gly Lys
1 5

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Gly Pro Ser Ser Val Glu Asp Ile Lys Ala Lys
1 5 10

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Phe Ile Asn Tyr Val Lys
1 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001870

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/47

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	ITAHANA Koji et al., Tumor Suppressor ARF Degrades B23, a Nucleolar Protein Involved in Ribosome Biogenesis and Cell Proliferation, Molecular Cell, 2003, Vol.12, pages 1151 to 1164, Summary; page 1155, right column, 5th line from the bottom and after	2, 3 1
Y	BRZOVIC Peter S. et al., Binding and recognition in the assembly of an active BRCA1/BARD1 ubiquitin-ligase complex, PNAS, 2003, Vol.100, No.10, pages 5646 to 5651, full text	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
29 March, 2005 (29.03.05)

Date of mailing of the international search report
19 April, 2005 (19.04.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001870

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HASHIZUME Rintaro et al., The RING Heterodimer BRCA1-BARD1 Is a Ubiquitin Ligase Inactivated by a Breast Cancer-derived Mutation, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2001, Vol.276, No.18, pages 14537 to 14540, full text	1
P,X	SATO Ko et al., Nucleophosmin/B23 Is a Candidate Substrate for the BRCA1-BARD1 Ubiquitin Ligase, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2004, Vol.279, No.30, pages 30919 to 30922, full text	1-3
P,X	HAYAMI Ryosuke et al., Down-regulation of BRCA1-BARD1 Ubiquitin Ligase by CDK2, Cancer Res., 2005, Vol.65, No.1, pages 6 to 10, full text	4-10
A	WANG H. et al., BRCA1 proteins are transported to the nucleus in the absence of serum and splice variants BRCA1a, BRCA1b are tyrosine phosphoproteins that associate with E2F, cyclins and cyclin dependent kinases, Oncogene, 1997, Vol.15, pages 143 to 157	10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001870

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The "special technical feature" of claims 1 to 4 relates to a method of the polyubiquitination of nucleophosmin. The "special technical feature" of claims 5 to 9 relates to a method comprising phosphorylating BARD1 by using CDK2-cyclin E and/or CDK2-cyclin A. The "special technical feature" of claim 10 relates to a method of transporting BRCA1 from nucleus to cytoplasm comprising simultaneously expressing BRCA1 with CDK2-cyclin E and/or CDK2-cyclin A. Since it does not appear that there is a technical relationship among these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features, these groups of inventions are not considered as being so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl. ⁷ C12N15/12、C07K14/47

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl. ⁷ C12N15/12、C07K14/47

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)
BIOSIS (STN)
JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	ITAHANA Koji et al., Tumor Suppressor ARF Degrades B23, a Nucleolar Protein Involved in Ribosome Biogenesis and Cell Proliferation, Molecular Cell, 2003, Vol. 12, p. 1151-1164, Summary 及び 1155 頁右欄下から 5 行目より	2、3 1
Y	BRZOVIC Peter S. et al., Binding and recognition in the assembly of an active BRCA1/BARD1 ubiquitin-ligase complex, PNAS, 2003, Vol. 100, No. 10, p. 5646-5651, 全文	1
Y	HASHIZUME Rintaro et al., The RING Heterodimer BRCA1-BARD1 Is	1

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.03.2005

国際調査報告の発送日 19.4.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
植原 克典

4B 9840

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	a Ubiquitin Ligase Inactivated by a Breast Cancer-derived Mutation, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2001, Vol. 276, No. 18, p. 14537-14540, 全文	
P X	SATO Ko et al., Nucleophosmin/B23 Is a Candidate Substrate for the BRCA1-BARD1 Ubiquitin Ligase, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2004, Vol. 279, No. 30, p. 30919-30922, 全文	1 - 3
P X	HAYAMI Ryosuke et al., Down-regulation of BRCA1-BARD1 Ubiquitin Ligase by CDK2, Cancer Res, 2005, Vol. 65, No. 1, p. 6-10, 全文	4 - 10
A	WANG H. et al., BRCA1 proteins are transported to the nucleus in the absence of serum and splice variants BRCA1a, BRCA1b are tyrosine phosphoproteins that associate with E2F, cyclins and cyclin dependent kinases, Oncogene, 1997, Vol. 15, p. 143-157	10

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-4の「特別な技術的特徴」はヌクレオフォスミンをポリユビキチン化する方法に関し、請求の範囲5-9の「特別な技術的特徴」はCDK2-サイクリンE及び／又はCDK2-サイクリンAを用いてBARD1をリン酸化することを含む方法に関し、請求の範囲10の「特別な技術的特徴」はBRCA1並びにCDK2-サイクリンE及び／又はCDK2-サイクリンAを共発現させることを含む、BRCA1を核から細胞質へ輸送させる方法に関する。これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。